



Síntese de novos complexos de ruténio para tratamento dos adenomas da hipófise

Anabela Fernandes Sanches

Mestrado em Química
Especialização em Química

Dissertação orientada por:
Dr. ^a Andreia Valente
Dr. ^a Fernanda Marques

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à minha orientadora, Doutora Andreia Valente por tornar possível a realização desta tese, e acima de tudo por todos os conhecimentos transmitidos, pela presença e orientação sem igual, pela paciência interminável e por todo o apoio nos momentos mais críticos.

À Doutora Fernanda Marques pela simpatia, ajuda e pelos ensinamentos transmitidos na realização dos estudos biológicos e, também pela paciência que teve, e por toda a dedicação e ajuda.

À professora Maria Helena Garcia por me ter acolhido tão bem no Grupo de Química Organometálica e pelo auxílio na concretização deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Guilherme Nogueira, Adhan Pilon, David Alves, Bebiana Pinto, Patrícia Gírio, Leonor Côrte-Real e Tânia Morais por toda a amizade, pelos momentos únicos que me proporcionaram, pelas palavras sinceras e de apoio nos momentos de aperto, pelo companheirismo, pelas brincadeiras e conversas hilariantes tanto no laboratório como nos almoços.

Aos meus pais e à minha irmã por acreditarem sempre em mim e por apoiarem sempre os meus sonhos.

Ao Nuno Rosa, por tudo aquilo que és e me transmites, por me suportares nos momentos difíceis e por nunca duidares das minhas capacidades, por me dares força nos momentos decisivos e por todo o amor.

Agradeço também à minha chefe, Ana Paula Ferreira por toda a preocupação e compreensão nesta reta final e por sempre me ter ajudado e ter feito os possíveis para que tudo corresse bem.

Por fim, mas não menos importantes a todos os meus amigos que de uma forma ou de outra tornaram os meus dias cheios de cor e alegria. Estiveram presentes em todos ou quase todos os momentos e fizeram a diferença, em especial à Cecília Rocha, ao Jorge Diniz, ao Rui Gomes, à Anastasia Sirbu, à Sara Ciríaco, à Leonor Abrantes, à Natascha Burity, ao Emanuel Amiguinho, à Isabel Tavares; ao Diogo Tavares, ao Bruno Paiva, à Catarina Gomes, entre muitos outros não menos especiais, estão todos guardados no meu coração.

Resumo

Os adenomas da hipófise não possuem uma causa bem definida, mas a sua presença causa perturbações que afetam significativamente o bem-estar humano. Estes tumores benignos apresentam uma grande diversidade estrutural e hormonal, desencadeando sintomas como enxaquecas, tonturas e perturbações oculares que raramente são associados a essa patologia.

Neste contexto, foi desenvolvido este trabalho que descreve a síntese e caracterização de três novos complexos organometálicos de ruténio com a fórmula geral $[\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_6)_2\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH})_n\text{L}]$ (onde quando $n = 2$, $\text{L} = \text{Cl}$ (**1**); $n = 1$, $\text{L} = 2$ -benzoílopiridina (**2**) ou 2-benzoílopiridina-(poli-LA-OC₇H₇) (**3**)). Os novos complexos foram sintetizados com rendimentos compreendidos entre 49 e 72% e foram caracterizados recorrendo às técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (¹H, ¹³C, ³¹P e técnicas bidimensionais), FTIR e espectroscopia UV-Visível. Foi também determinado o grau de pureza por análises elementares, quando possível.

A atividade citotóxica dos novos compostos foi avaliada em duas linhas celulares não-tumorais do adenoma da hipófise, GH3, secretora de prolactina e hormona de crescimento, e MMQ, secretora de prolactina, e uma linha celular tumoral do glioma humano, U87. Verificou-se que os compostos sintetizados não apresentam atividade citotóxica relevante nas linhas celulares estudadas. Este resultado está de acordo com o objetivo pretendido, uma vez que se pretende a futura aplicação dos novos complexos em terapia fotodinâmica e/ou de irradiação de fótons, onde os compostos são ativados por intermédio da exposição à luz visível ou fótons, respetivamente.

Palavras-chave

Ruténio (II); Ciclopentadienilo; Polilactídeo; Adenomas da hipófise;

Abstract

The pituitary adenomas do not have a well-defined cause, but their presence causes perturbations that significantly affect human well-being. These benign tumours show a major structural and hormonal diversity, triggering symptoms such as headaches, dizziness and eye disorders that are rarely associated with their occurrence.

The present work describes the synthesis and characterizes three new Ruthenium organometallic complexes that have the general formula $[\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_6)_2\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH})_n\text{L}]$ (where, when $n=2$ $\text{L} = \text{Cl}$ (**1**); $n = 1$, $\text{L} = 2\text{-benzoylpyridine}$ (**2**) or $2\text{-benzoylpyridine}-(\text{poli-LA-OC}_7\text{H}_7)$ (**3**)). The new synthesized complexes have yields between 49% to 72% and were characterized using spectroscopy techniques of nuclear magnetic resonance (^1H , ^{13}C , ^{31}P and bidimensional techniques), FTIR and UV-Visible spectroscopy. Whenever possible, their purity was also determined by elementary analysis.

The cytotoxic activity of new compounds was evaluated in two non-tumor cell lines of pituitary adenomas, GH3, that secretes prolactin and growth hormone, and MMQ, that secretes prolactin, and also, in a tumor cell line of human's glioma, U87. It was found that in those cell lines the synthesized compounds do not have a significant cytotoxic activity. This result is consistent with work's objective, as these new complexes are planned to be used in photodynamic and/or photon irradiation therapies, in which these compounds will be activated by exposure to visible light or photons, respectively.

Keywords

Ruthenium (II); Cyclopentadienyl; Polylactide; Pituitary adenomas;

Índice Geral

Capítulo 1: Introdução	2
1.1. Adenomas	2
1.1.1. Adenomas hipofisários ou pituitários	2
1.1.2. Adenomas versus Adenocarcinomas	5
1.2. Terapias	5
1.2.1. Cirurgia	6
1.2.2. Radioterapia	6
1.2.3. Quimioterapia	6
1.2.4. Terapia fotodinâmica	7
1.3. Desenvolvimento de metalofármacos para uso medicinal	8
1.3.1. Complexos de Platina	9
1.3.2. Complexos de rutênio	11
1.3.3. Complexos de Rutênio-Ciclopentadienilo	13
1.3.4. Complexos poliméricos de rutênio	15
1.4. Enquadramento do presente trabalho	17
Capítulo 2: Síntese e Caracterização do Polímero	19
2.1. Introdução	19
2.2. Polimerização por abertura de ciclo	19
2.2.1. Polimerização catiónica via monómero ativado	20
2.3. Síntese do Polímero Polilactídeo	20
2.4. Caracterização do Polímero	21
2.4.1. Espectroscopia de ^1H -RMN e determinação da massa molecular	21
Capítulo 3: Síntese e Caracterização dos Complexos Organometálicos	25
3.1. Introdução	25
3.2. Síntese dos complexos organometálicos	25
3.2.1. Síntese do complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH})_2)\text{Cl}]$ (1)	25
3.2.2. Síntese do complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH})(\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO}))][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ (2)	26
3.2.3. Síntese do complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH})((\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO})-(\text{poli-LA-OC}_7\text{H}_7))][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ (3)	26
3.3. Sínteses não conclusivas/ inconclusivas	34
Capítulo 4: Estudos Biológicos	39
4.1. Estudos de estabilidade em solvente orgânico e meio de cultura celular	39
4.2. Estudos de viabilidade celular	41
Capítulo 5: Materiais e Métodos	49
5.1. Considerações Gerais	49
5.2. Solventes e Reagentes	49
5.3. Técnicas usadas	49
5.3.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	49

5.3.2.	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	50
5.3.3.	Espectroscopia de Ultravioleta e Visível (UV-Vis)	50
5.3.4.	Análise Elementar	50
5.3.5.	Estudos Biológicos	50
5.4.	Procedimentos	52
5.4.1.	Síntese e caracterização do polímero	52
5.4.2.	Síntese dos compostos organometálicos.....	53
5.4.3.	Síntese não concluídas/ inconclusivas	55
Capítulo 6: Conclusões e Perspetivas Futuras		58
Bibliografia		I
Anexos		i

Índice de Figuras

Figura 1- Localização e fisionomia da Hipófise ³	2
Figura 2 - Esquema representativo do cérebro, constituição da glândula pituitária e hormonas secretadas ⁵	3
Figura 3- Representação do modo de ação da terapia fotodinâmica ⁴¹	7
Figura 4 - Principais áreas de aplicação da Química Inorgânica Médica ¹⁸	8
Figura 5- Representação estrutural da cisplatina	10
Figura 6 - a) Representação estrutural da carboplatina; b) Representação estrutural da oxaliplatina; c) Representação estrutural da nedaplatina ²²	11
Figura 7 - Fórmula estrutural do NAMI-A.....	12
Figura 8- Fórmula estrutural do KP1019	12
Figura 9 - Representação estrutural do TM34 ²⁴	14
Figura 10 - Fórmula estrutural do TM90 ²⁷	15
Figura 11 - Representação esquemática do efeito EPR ²⁸	16
Figura 12- Representação estrutural do primeiro RuPMC ²⁹	16
Figura 13 – Espectro de ¹ H RMN do PLA em acetona-d6	22
Figura 14 – Espectro ¹ H RMN do complexo (1) (cima) e do ligando fosfano livre (baixo) em acetona d-6 e respetivos desvios químicos assim como a diferença entre os desvios químicos do fosfano livre e quando coordenado	28
Figura 15 - Espectro ¹ H RMN do complexo (2) em metanol-d4.....	29
Figura 16 – Espectro ¹ H RMN relativo ao complexo (3)	31
Figura 17 – Espectro eletrónico do complexo (1) em DMSO e Metanol	32
Figura 18 - Espectros eletrónicos dos complexos (2) e (3) em CH ₂ Cl ₂	33
Figura 19 – Representação estrutural da temozolomida.....	35
Figura 20 - Mecanismo de redução no ensaio colorimétrico MTT	42
Figura 21 - Mecanismo de deteção de viabilidade celular com WST-8	43

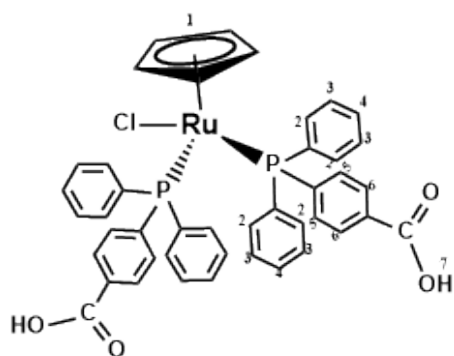
Índice de Esquemas

Esquema 1 – Mecanismo de polimerização do PLA.....	20
Esquema 2 – Esquema da polimerização do álcool benzílico com o PLA.....	21

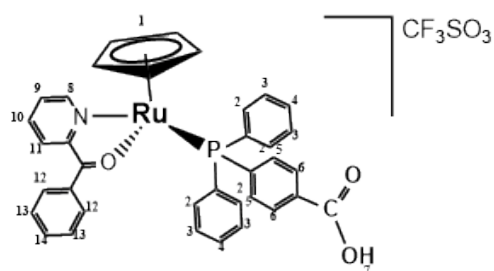
Índice de Tabelas

Tabela 1- Metais com aplicação medicinal ¹⁸	9
Tabela 2 – Análise elementar do complexo (1)	27
Tabela 3 – Análise elementar do complexo (2)	27
Tabela 4 - Valores de desvio químico do espectro ³¹ P para o complexo (1) e respetivo fosfano livre e para o complexo [RuCp(PPh ₃) ₂ Cl] e respetivo fosfano livre	29
Tabela 5 – Valores de desvios químicos do espectro 1H RMN para o PLA e complexo (3)	30
Tabela 6 – Dados espectroscópicos de IV para os complexos sintetizados.....	34
Tabela 7 - Procedimento de secagem dos diversos solventes utilizados.....	49
Tabela 8 – Processo de secagem dos diferentes solventes utilizados	52

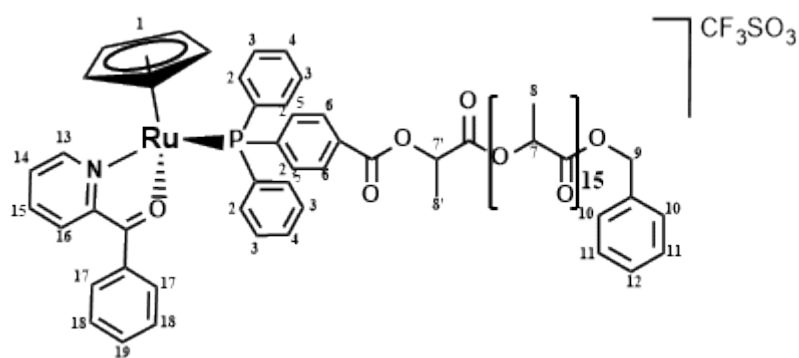
Índice de Complexos



Complexo (1)



Complexo (2)



Complexo (3)

Abreviaturas

COSY – Correlation Spectroscopy

Cp – Ciclopentadienilo

d – dobleto

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMAP – 4-dimetilaminopiridina

DP – Grau de Polimerização (Degree of Polymerization)

EPR – *Enhanced Permeability and Retention*

et al. – *et alii* (e outros)

Éter – Éter etílico

FTIR – Fourier Transform InfraRed (Infravermelho por transformada de Fourier)

GH3 – Linha celular secretora de prolactina e hormona de crescimento

HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC - Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

IC₅₀ – Half maximal inhibitory concentration (concentração inibitória a 50%)

IV – Infravermelho

m – Multiplete

M – Molar (moles por litro)

Maldi-ToF - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight

MMQ – Linha celular secretora de prolactina

MTT – (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

NOESY – Nuclear Overhauser effect spectroscopy

OMS – Organização Mundial de Saúde

Ph – Fenilo

PLA - Polilactídeo

ppm – Partes por milhão

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de carbono

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de protão

RMN ³¹P – Ressonância Magnética Nuclear de fósforo

s – Singleto

t – Tripleto

U87 – Linha celular do glioma humana

TEA – Trietilamina

TMS – Tetrametilsilano

UV-Vis – Espectroscopia de Ultravioleta e Visível

δ /ppm – Desvio químico em partes por milhão

ϵ - Coeficiente de absortividade molar (UV-Vis)

λ – Comprimento de onda

ν – Frequência máxima de absorção em IV

Capítulo 1

Introdução

Capítulo 1: Introdução

1.1. Adenomas

A palavra “adenoma” é de origem grega onde “*aden*” significa glândula e “*oma*” significa tumor, a sua associação tem como significado tumor de origem glandular.

Os adenomas são tumores não-cancerígenos ou benignos que possuem a capacidade de afetar diversos órgãos. Possuem um crescimento lento e uma capacidade de proliferação muito reduzida, porém têm o potencial de se tornarem tumores malignos¹.

1.1.1. Adenomas hipofisários ou pituitários

A hipófise ou glândula pituitária está situada numa estrutura óssea denominada sela turca (ou sela túrcica), Fig. 1, inserida no crânio e localizada debaixo do cérebro. A glândula pituitária é uma pequena glândula com cerca de 1 cm de diâmetro, que tem uma organização relativamente simples e apresenta um papel fulcral sobre o sistema endócrino. É constituída por dois lobos, o anterior ou adeno-hipófise, que produz e liberta hormonas, e o posterior ou neuro-hipófise, que armazena e liberta algumas hormonas. Embora controle o funcionamento das outras glândulas endócrinas, a sua ação é controlada pelo hipotálamo. Este órgão, é responsável pela produção de uma elevada quantidade de hormonas, sendo que cada uma atua sobre uma região específica do organismo².

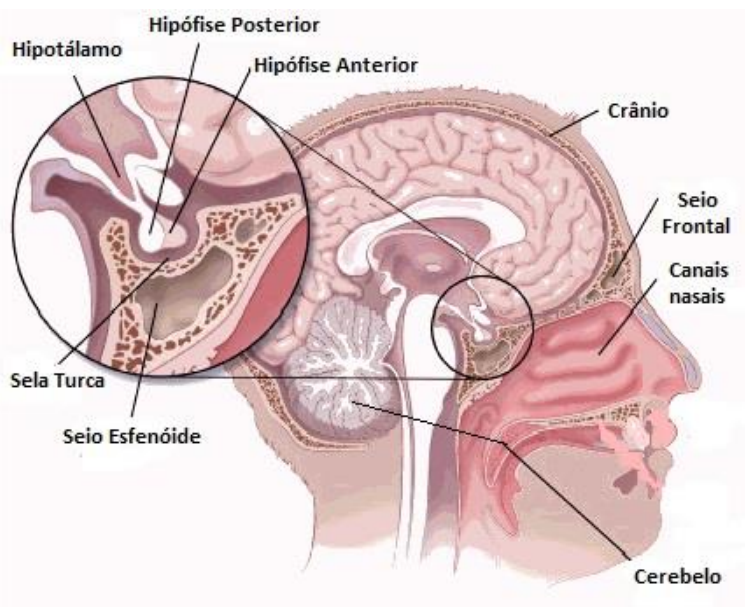


Figura 1- Localização e fisionomia da Hipófise³

A adeno-hipófise é constituída por sete tipos de células distintas responsáveis pela secreção de hormonas. Sendo elas, as melanotrópicas responsáveis pela produção da hormona

melanotropina, as corticotrópicas que produzem a adenocorticotropina (ACTH), as gonadotrofos que produzem as gonadotrofinas, hormona folículo-estimulante (FSH) e a hormona luteinizante (LH), as somatotrofos que produzem a hormona de crescimento (GH), as lactotrofos que produzem a hormona prolactina (PRL) e, finalmente as tierotrofos que produzem a hormona tierotrofina ou hormona estimulante da tiróide (TSH)^{2,4}.

A neuro-hipófise encontra-se ligada ao hipotálamo pelo infundíbulo. O hipotálamo é responsável pela produção de hormonas, que posteriormente são transportadas pelos axónios das células nervosas até à neuro-hipófise, onde são armazenadas. As hormonas armazenadas são as endorfinas, a oxitocina e a antidiurética^{2,4}.

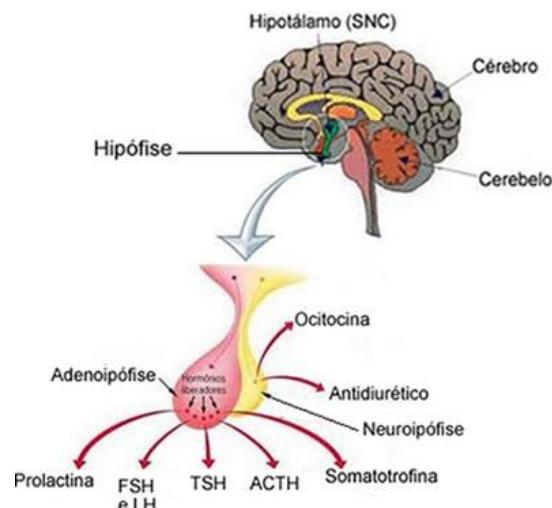


Figura 2 - Esquema representativo do cérebro, constituição da glândula pituitária e hormonas secretadas⁵

As doenças que mais afetam a hipófise relacionam-se com o risco de compressão da sela turca, que serve para proteger a hipófise. A sela turca é uma pequena saliência no osso, e o crescimento da hipófise implica a sua compressão. A glândula hipofisária regula muitas funções de outras glândulas endócrinas e os seus tecidos-alvo no organismo, e todos os órgãos ou tecidos são afetados, direta ou indiretamente, pela secreção de hormonas da hipófise⁴.

Os adenomas hipofisários são tumores glandulares benignos presentes na glândula hipofisária que podem provocar sintomas neurológicos e hormonais. Estas neoplasias epiteliais benignas comumente bem diferenciadas não se difundem além do crânio e, normalmente, permanecem confinadas à sela túrcica, podendo desenvolver-se nas suas paredes e ao redor dos vasos sanguíneos, nervos e revestimentos do cérebro. Embora não se espalhe para outras partes do corpo, o desenvolvimento de adenomas nesta região acarreta problemas graves tendo em conta que o espaço é reduzido⁶.

Os adenomas pituitários podem ser classificados em microadenomas ou macroadenomas. Os microadenomas consistem em tumores com dimensões inferiores a um centímetro, que raramente danificam os tecidos próximos da glândula hipofisária. Podem estar

presentes no organismo sem nunca serem detetados devido ao seu tamanho reduzido ou por não existir uma libertação de hormonas suficiente para originar sintomas. Por outro lado, os macroadenomas são lesões benignas com dimensões superiores a um centímetro de diâmetro que podem afetar gravemente a saúde, pela pressão exercida sobre o tecido pituitário normal ou nervos periféricos, como os nervos óticos⁷.

Além da classificação anteriormente mencionada, os adenomas pituitários também se dividem em adenomas não-funcionais, que representam a maioria e estão associados a um aumento ou redução de massa intracraniana, e adenomas funcionais, que estão relacionados com síndromes clínicas específicas devido a alterações (aumento ou redução) na secreção de hormonas hipofisárias, tais como, prolactina, hormona de crescimento, hormona adenocorticotrópica, entre outras, que atuam sobre órgãos específicos⁸. A existência de disfunção da hipófise é muito comum, no entanto as manifestações de doenças associadas à hipófise variam consoante diversos fatores tornando difícil o seu diagnóstico e a sua associação direta com problemas na hipófise⁹. Muitas destas lesões são detetadas acidentalmente, o que tem despertado um especial interesse uma vez que possui um impacto reconhecido na fertilidade, longevidade e qualidade de vida. Além disso, a gestão destas lesões tem sofrido mudanças consideráveis com o desenvolvimento de novos agentes farmacoterapêuticos, evitando as abordagens cirúrgicas minimamente invasivas e optando pela utilização de radioterapia¹⁰.

A análise morfológica na classificação desta patologia possui um papel fulcral no seu diagnóstico¹⁰. Estes tumores representam mais de 25% dos tumores intracranianos.

Um estudo recente em material de autópsia mostrou que a prevalência de adenomas hipofisários é de 14,4%, e em estudos radiológicos a lesão foi identificada com uma persistência de 22,5% na população, originando uma prevalência global estimada de 16,7%⁷, afetando ambos os sexos da mesma forma⁹.

Um estudo realizado em Liège (Bélgica), relativo à prevalência de adenomas da hipófise ou pituitários, mostrou que aproximadamente 1 em cada 1000 pessoas possui este tipo de tumor, estes valores clinicamente diagnosticados são 3,5 a 5 vezes mais frequentes do que se pensava¹¹, pois a prevalência de tumores pituitários varia consoante o alvo de pesquisa, mais precisamente, a amostra sobre a qual incide o estudo, que pode ser sobre material cirúrgico ou material de autópsia. Como referido anteriormente, os estudos *in vivo* representam 10-15% dos tumores intracranianos diagnosticados clinicamente. Contudo, em estudos realizados com material de autópsia estes valores aumentam para 20-25%, podendo mesmo atingir quase 40% em estudos imagiológicos⁷.

Um estudo cruzado realizado com habitantes das regiões de Fribourg (Suíça), Liège (Bélgica) e Oxfordshire (Reino Unido) indicou que a prevalência de adenomas hipofisários

também é cerca de 3 a 5 vezes superior ao que se pensava, e verificou-se a existência de 78 a 94 casos em 100.000 habitantes. Neste estudo também se verificou que os adenomas funcionais associado à secreção da hormona prolactina (44 casos/100.000 habitantes) são os mais comuns, seguindo-se os adenomas não funcionais (22 casos/100.000 habitantes)¹².

Os adenomas hipofisários não possuem uma causa bem definida, podendo resultar de mutações isoladas em células pituitárias normais¹³. Apresentam uma grande diversidade estrutural e hormonal, variando a sua classificação em microadenomas ou macroadenomas e funcionais ou não-funcionais, como já foi referido anteriormente. Consequentemente, o tratamento implementado nem sempre é o mais eficaz, existem alguns medicamentos em uso clínico, contudo é necessário a procura de novos fármacos que tenham um espectro de ação mais alargado e específico do que os medicamentos usados atualmente, constituindo um propósito fundamental para o tratamento desta patologia.

1.1.2. Adenomas versus Adenocarcinomas

O adenocarcinoma é um tumor maligno que tem origem no tecido glandular. O crescimento e proliferação descontrolada de células anormais pode afetar qualquer parte do corpo humano, uma vez que pode invadir os tecidos vizinhos podendo metastizar para os tecidos/órgãos de todo o organismo¹⁴. As causas que estão na origem desta doença são diversas e incluem fatores externos, como radiação, químicos e vírus, e fatores internos, tais como, hormonas, condições imunológicas e mutações hereditárias¹⁵.

A principal diferença entre adenomas da hipófise e adenocarcinomas reside no tipo de tumor. Os adenomas são tumores benignos formados por células adultas que crescem de forma ordenada e lenta, e os tumores malignos, como é o caso do adenocarcinoma e de outros tipos de cancro, são constituídos por células que apresentam um crescimento rápido e descontrolado e possuem a capacidade de metastizar para qualquer órgão/tecido do organismo.

1.2. Terapias

O tratamento dos adenomas hipofisários está longe de ser uma tarefa fácil assim como o tratamento do cancro, embora sejam patologias distintas os tipos de tratamento implementados são semelhantes. Os adenomas da hipófise na maioria dos casos são detetados, tardiamente, na autópsia. Contudo, os recentes estudos realizados têm incidido na procura de um tratamento seletivo e eficaz devido à variedade estrutural e hormonal destes adenomas. Esta variedade metabólica e genética indicam que o tratamento não é um procedimento exato, e que os resultados do tratamento podem ser imprevisíveis¹⁶.

Ao longo de várias décadas, diversos têm sido os esforços feitos no sentido de encontrar o tratamento mais adequado e específico para combater esta patologia. Os tratamentos mais frequentes são cirurgia, radioterapia, quimioterapia e, mais recentemente, a terapia fotodinâmica¹⁶.

1.2.1. Cirurgia

É o tratamento mais antigo utilizado nesta vertente. Neste procedimento parte do tumor e do tecido circundante é removido através de cirurgia, uma vez que o tumor pode invadir os tecidos vizinhos. Este tipo de tratamento permite a remoção do tumor, quando o mesmo se encontra confinado a uma região, sem danificar outros órgãos e sem problemas graves associados¹⁶.

1.2.2. Radioterapia

A radioterapia começou a ser utilizada a partir da descoberta dos raios-X, em 1895, pelo cientista alemão Wilhelm Röntgen. Este tratamento baseia-se na aplicação de radiação de elevada energia, como os raios-X, raios gama (γ) ou partículas subatômicas, direcionada para a área afetada com o intuito de danificar as células tumorais, interferindo com o seu ADN, impedindo assim que estas se consigam reproduzir. Existem diferentes tipos de radiação, que pode ser administrada isolada ou associadamente: radiação externa, radiação interna e radiação sistémica. Embora este tipo de tratamento seja uma alternativa à cirurgia, quando a mesma não é viável ou acarreta riscos consideráveis, a radiação afeta não só as células tumorais como as células saudáveis. Ainda assim, é o principal tratamento para certos tipos de tumores, como é o caso do cancro da laringe (cordas vocais), pulmão, colo do útero, próstata, tireoide, cérebro assim como tumores benignos. Este tratamento possui alguns efeitos secundários, tais como, queda de cabelo, ardor na pele, náuseas, vômitos, entre outros.

Uma das limitações desta terapia é a impossibilidade de remover tumores de grandes dimensões, pois as células tumorais do centro do tumor recebem uma quantidade de oxigénio através do sangue deficiente e, por isso, não se dividem tão rapidamente como as células tumorais que se encontram à superfície, consequentemente muitas delas não são afetadas pela radiação terapêutica. Nestes casos recorre-se à cirurgia, ou a terapia combinada, onde se utilizam técnicas distintas em simultâneo¹⁶.

1.2.3. Quimioterapia

A quimioterapia é o método terapêutico mais utilizado, em todo o mundo, para combater todos os tipos de tumores (benignos e malignos). Este tratamento pressupõe a administração de fármacos por via oral ou intravenosa, sendo o fármaco transportado através

da corrente sanguínea até aos órgãos/tecidos-alvo. O fármaco interfere com o processo de divisão celular e outros processos celulares durante as diferentes fases do ciclo de vida de uma célula anómala. Além disso esta terapia aplica-se nos casos em que os tumores metastizaram. Em contraste, enquanto as terapias referidas anteriormente requerem que o tumor se encontre num local específico para que ambas se possam aplicar, este tipo de terapia pode ser implementado quer o tumor se encontre num único local ou caso já tenham ocorrido metástases. É o único tratamento para alguns tipos de tumores, como, leucemia e linfoma, que não estão confinados a um único órgão/tecido do corpo humano.

Porém, esta terapia destrói não só as células anormais como as células saudáveis, e, portanto, pode causar efeitos adversos que depende do tipo de fármaco administrado. Os principais efeitos secundários associados a esta forma de terapia são náuseas, vômitos, diarreia e danos em diversos órgãos e na medula óssea. Em muitos casos, utiliza-se também terapia combinada¹⁶.

1.2.4. Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica, é uma nova abordagem muito auspiciosa, para a destruição de células anómalas. Consiste na utilização de um fármaco fotossensível que absorve um fóton de energia com um comprimento de onda específico e transfere essa energia para o oxigénio. Assim, para esta forma de terapia é necessária uma fonte de luz visível, oxigénio e um fármaco fotossensível que tenha a capacidade de se acumular preferencialmente nas células anómalas, e que simultaneamente absorva radiação. O fotossensibilizador pode ser qualquer molécula que utilize a radiação visível para dar uma resposta específica. A janela terapêutica para esta terapia situa-se entre os 600-1100 nm, ou seja, na região do visível¹⁵.

Numa primeira etapa a droga é administrada via intravenosa, como observado na Fig. 3, e após a injeção do fármaco, é necessário um período de incubação para que o composto seja expelido pelas células saudáveis e se acumule preferencialmente nas células tumorais, através de um mecanismo que ainda não é bem conhecido. Quando se atinge a concentração ideal de fármaco nas células tumorais, faz-se incidir radiação com um determinado comprimento de onda, durante um certo período de tempo, ativando assim a ação da droga fotossensível, por excitação de um eletrão. Após a ativação do fármaco, ocorre a produção de oxigénio singlete que reage com as moléculas biológicas, tais como, aminoácidos, lípidos e esteroides, perturbando o desenvolvimento das células e provocando a sua morte. Na ausência de radiação o fármaco não deverá ser tóxico, constituindo assim uma

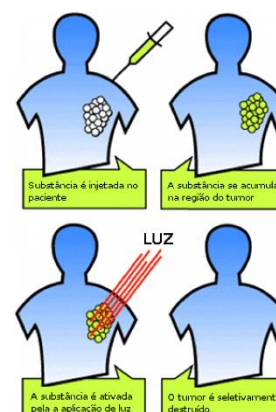


Figura 3- Representação do modo de ação da terapia fotodinâmica⁴¹

mais valia. Contudo, para prevenir a destruição das células saudáveis, a fonte de radiação é direcionada somente para a região infectada¹⁷.

Esta técnica tem sido extensivamente explorada para o tratamento de tumores sólidos e já mostrou ser bastante eficiente no tratamento de tumores na pele, esôfago, pulmões e bexiga. Apresenta-se como uma metodologia vantajosa, na medida em que os compostos utilizados possuem uma toxicidade seletiva, ativada por intermédio da exposição à luz visível vermelha (> 650 nm), e possui menos efeitos colaterais em comparação com a quimioterapia e a radioterapia¹⁵.

1.3. Desenvolvimento de metalofármacos para uso medicinal

A química inorgânica medicinal é uma área que envolve diferentes conceitos, como representado na Fig. 4. São numerosos os iões metálicos que desempenham um papel vital em sistemas biológicos e, atualmente, muitos compostos à base de metais ou sais de metais são administrados a pacientes para seu benefício terapêutico e para diagnóstico. Além disso, existem nutrientes à base de metais essenciais que habitualmente são fornecidos sob a forma de suplemento para superar as deficiências existentes. A capacidade de reconhecer, compreender ao nível molecular e tratar as doenças provocadas pela deficiência de metais constitui um aspeto importante para a química medicinal bioinorgânica.



Figura 4 - Principais áreas de aplicação da Química Inorgânica Médica¹⁸

Contudo, os metais têm sido utilizados para diversas finalidades, destacando-se o seu uso, há várias décadas, para o tratamento de diversas patologias, tabela 1.

Tabela 1- Metais com aplicação medicinal¹⁸

Metais	Aplicação
Arsénio	Tratamento de Leucemia
Bismuto	Antibacteriano; Tratamento de problemas gastrointestinais e de pele
Cobalto	Diagnóstico e tratamento de anemia perniciosa; Suplemento dietético
Cobre	Tratamento da doença de <i>Menke's</i> ; PET
Ferro	Diagnóstico - Agente de contraste em ressonância magnética (MRI);
Potássio	Tratamento da tuberculose
Platina	Agente antitumoral
Tecnécio	Diagnóstico - Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT)

O desenvolvimento de metalofármacos para o tratamento de doenças tem crescido exponencialmente. No entanto, ainda não existe um tratamento de largo espectro de ação tanto para os adenomas da hipófise como para os adenocarcinomas. Contudo, os tratamentos utilizados para o cancro têm sido empregues no tratamento dos adenomas da hipófise, tendo em conta que as células também são defeituosas. A temozolomida é um fármaco que possui atividade antitumoral contra tumores cerebrais, é usado no tratamento de cancros cerebrais assim como no tratamento de adenomas da hipófise¹⁹. Portanto, os metalofármacos desenvolvidos para a terapia do cancro poderão, à partida, ser empregues no tratamento dos adenomas da hipófise. Tendo isto em vista, no sub-capítulo seguinte irão apresentar-se alguns metalofármacos utilizados com sucesso no tratamento do cancro, e os novos desenvolvimentos nesta área do Grupo de Química Organometálica da Universidade de Lisboa, onde este trabalho se desenvolveu.

1.3.1. Complexos de Platina

Os metais, em particular, os metais de transição, possuem diversas vantagens em relação aos fármacos orgânicos, das quais se destacam, a existência de uma grande variedade de números de coordenação, diversas geometrias possíveis, estados de oxidação acessíveis e

estáveis, facilidade na substituição de ligandos favorecida pela cinética e pela termodinâmica, e uma grande diversidade estrutural²⁰.

A química inorgânica médica é uma área de investigação em vasta expansão, o seu início foi marcado pela descoberta das propriedades anti-tumorais da cisplatina, Fig. 5, em 1965, por Barnett Rosenberg. Hoje em dia, ainda é um dos fármacos mais vendidos em todos o mundo, após a sua aprovação como agente quimioterapêutico, em 1978.

É utilizado principalmente, para o tratamento do cancro do ovário, do testículo, da cabeça, do pescoço, da bexiga, da cervical e de linfomas.

Apesar do sucesso da cisplatina, nos últimos anos têm sido desenvolvidos diversos análogos com o intuito de aumentar a sua eficácia e diminuir os seus severos efeitos secundários.

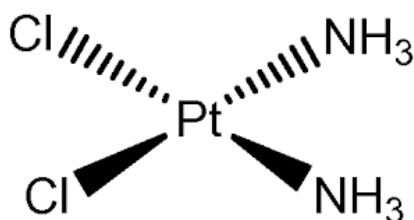


Figura 5- Representação estrutural da cisplatina

Nesse sentido, surgiu a carboplatina (Fig. 6a) - [cis-diamino(ciclobutano-1,1-dicarboxilato) de platina(II)], onde o seu design teve como principal objetivo a redução dos efeitos secundários e a toxicidade da cisplatina. A sua utilização em ensaios clínicos remonta a 1993. Este fármaco produz o mesmo componente ativo que a cisplatina e forma os mesmos aductos com o ADN. Por isso, pode ser administrado para os mesmos tipos de cancro do que a cisplatina, sendo principalmente utilizada para o cancro do ovário²¹.

Posteriormente, surgiu a oxaliplatina (Fig. 6b) – [1,2-diamino-ciclohexano-oxalato de platina (II)] - que entrou em uso clínico em 1996 em França, foi o primeiro agente antitumoral a superar a resistência das células cancerígenas devido à formação de diferentes aductos com o ADN²¹. Este fármaco, atualmente, é utilizado no tratamento adjuvante do cancro colo-rectal metastático associado com 5-FU (fluorouracilo) e ácido folínico²¹.

A nedaplatina (Fig. 6c), [diamino(2-hidroxiacetato) de platina(II)], que marca a segunda geração de análogos de platina e que apresenta uma solubilidade em água dez vezes superior que a cisplatina, e é significativamente menos nefrotóxica do que a cisplatina e a carboplatina. Estudos clínicos realizados evidenciaram que este fármaco possui atividade anticancerígena superior à da carboplatina e equivalente à da cisplatina. A substituição da cisplatina pela nedaplatina mostrou ser vantajosa nos casos em que os pacientes além de cancro sofriam de

insuficiência renal. Este fármaco reduziu a nefrotoxicidade e apresenta pouca afinidade para se ligar às proteínas²¹.

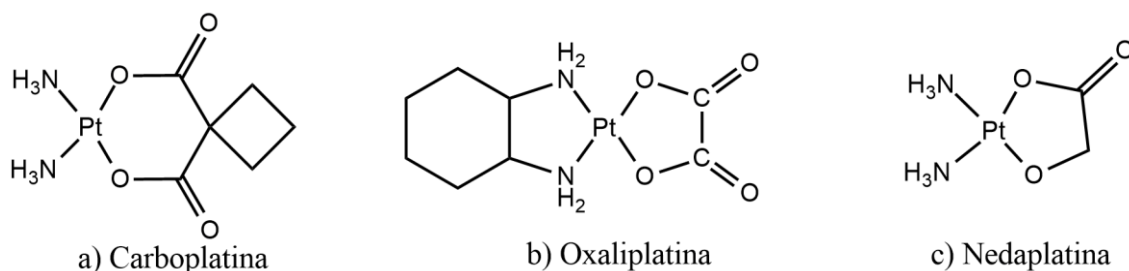


Figura 6 - a) Representação estrutural da carboplatina; b) Representação estrutural da oxaliplatina; c) Representação estrutural da nedaplatina²²

Apesar dos compostos de platina serem bastante eficazes no tratamento de muitos tumores e de todos os esforços realizados no sentido de melhorar as suas características e eficácia existem algumas limitações, tais como, eficácia para apenas um número limitado de tipos de cancro, alguns tumores podem adquirir resistência, e muitas vezes causam graves efeitos colaterais, como, náuseas, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade e mielossupressão.

Embora cerca de dez outros compostos de platina estejam atualmente em uso clínico, os derivados de platina não mostraram ser capazes de resolver suficientemente muitas das desvantagens associadas à cisplatina. A necessidade de procura de novas abordagens e de novos fármacos é necessária no sentido de contornar estas adversidades²⁰.

1.3.2. Complexos de ruténio

O sucesso da cisplatina como agente anticancerígeno desencadeou a procura de novos compostos metálicos que apresentassem igual ou melhor atividade antitumoral e, simultaneamente, baixa toxicidade. Deste modo, surgiu o ruténio com um futuro muito promissor.

O ruténio (grupo 8 da tabela periódica), apresenta diversas propriedades que o elegem como ideal para uso terapêutico. As principais propriedades que o determinam como sucessor da cisplatina no combate de tumores são²³ :

- ✓ Existência de múltiplos estados de oxidação acessíveis e estáveis (II, III e IV) em condições fisiológicas;
- ✓ Capacidade de mimetizar o ferro na ligação a certas moléculas biológicas, tais como, a transferrina e a albumina;
- ✓ Cinética de substituição de ligandos favorável e semelhante ao da platina;
- ✓ Diferentes números de coordenação e geometrias possíveis;

- ✓ Variedade de ligandos a que se pode coordenar.

Além das características salientadas anteriormente, os compostos de ruténio são conhecidos por serem menos tóxicos do que a cisplatina. Conhecidas as suas propriedades, muitos compostos de ruténio começaram a ser desenvolvidos como potenciais fármacos, e dois complexos de ruténio foram aprovados para ensaios clínicos, o NAMI-A e o KP1019²³.

O NAMI-A, $[(H_2im)(trans-Ru^{III}Cl_4(Him)(S-DMSO))](Im=imidazole; DMSO=dimetilsulfóxido)$ (Fig. 7), foi o primeiro complexo de ruténio a entrar em estudos clínicos.

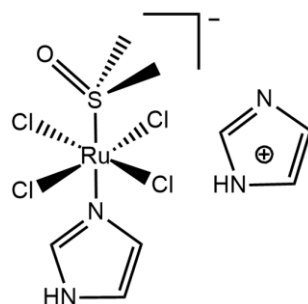


Figura 7 - Fórmula estrutural do NAMI-A

Este composto apresenta atividade antitumoral, destacando-se por possuir maior atividade contra metástases do que contra tumores primários. Os principais tumores metastáticos em que este fármaco é ativo são: cancro do colo-rectal, do pulmão, melanoma, do ovário e pancreático.

O KP1019, $[(H_2ind)(trans-Ru^{III}Cl_4(Hind)_2)]$ (Ind= indazol), é também um complexo de ruténio (III) que contém dois ligandos heterocíclicos de indazol coordenados ao centro metálico através dos átomos de azoto, como representado na Fig. 8.

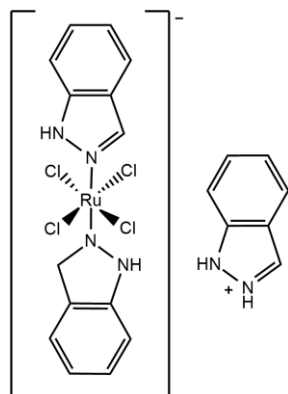


Figura 8- Fórmula estrutural do KP1019

Este complexo de ruténio apresenta uma atividade citotóxica direta, através da indução de apoptose, em várias linhas celulares tumorais, especialmente para a linha celular do cancro colo-rectal.

Após o NAMI-A e o KP1019, um grande número de complexos de ruténio foram sintetizados e testados quanto à sua atividade antitumoral em diversas linhas celulares.

A pesquisa tem-se centrado no potencial anticancerígeno dos complexos de ruténio-areno, $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-areno})]$. Estes complexos de “*half-sandwich*” com conformação tipo banco de piano (*piano-stool*) oferecem diversas possibilidades para o design de diversos complexos, permitindo um leque de modificações (areno, ligando quelato e ligando monodentado), possibilitando a alteração da cinética e da termodinâmica, e melhorar assim as suas propriedades²⁰. São provavelmente o grupo de compostos de Ru(II) mais numeroso, descritos na literatura como potenciais metalofármacos²⁴, uma vez que exibem propriedades anticancerígenas contra uma variedade de tipos de tumores, principalmente contra linhas celulares tumorais resistentes ao tratamento com cisplatina²⁵.

Uma nova série de complexos de ruténio foi desenvolvida em 2004, caracterizados pela presença de um ligando 1,3,5-triaza-7-fosfoadamanteno, vulgarmente conhecidos como RAPTAs. Segundo a literatura, estes compostos apresentam baixa citotoxicidade contra células tumorais *in vitro*, e não são tóxicas para as células saudáveis, mesmo durante um período longo de exposição. Os RAPTAs são capazes de inibir alguns passos do processo metastático, por interferirem no comportamento celular durante o processo de metátese²¹.

1.3.3. Complexos de Ruténio-Ciclopentadienilo

De acordo com os avanços conseguidos no campo do design de metalofármacos e com base no fragmento “Ru-Cp” (Cp = $\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5$) foram sintetizados diversos complexos pelo Grupo de Química Organometálica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa que mostraram resultados muito promissores como potenciais quimioterapêuticos.

Entre eles destaca-se o complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(2,2'\text{-bipiridina})(\text{PPh}_3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]$, vulgarmente conhecido como TM34²⁴ (Fig. 9), que contém na sua esfera de coordenação um ligando bidentado, a bipiridina, um trifenilfosfano, para além, do ciclopentadienilo. O TM34 apresenta um largo espectro de atividade contra células tumorais, em grande parte, superando a cisplatina na eficácia²⁴.

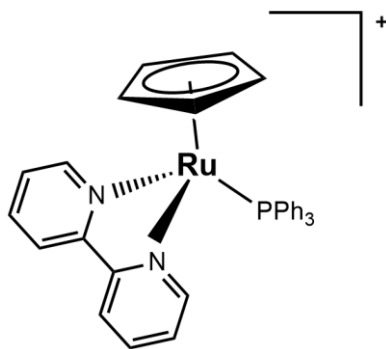


Figura 9 - Representação estrutural do TM34²⁴

Este composto exibiu uma elevada citotoxicidade contra linhas celulares distintas, nomeadamente, a linha do carcinoma humano do ovário, A2780 e A2780cisR, onde mostrou ser 17 e 100 vezes mais ativo, respetivamente, a linha do carcinoma da próstata (PC3) e linha do carcinoma da mama (MCF7) onde mostrou ser 100 vezes mais ativo quando comparado com a cisplatina, ultrapassando largamente a atividade da cisplatina, especialmente contra a linha celular resistente. Além disso, mostrou também ser bastante ativo contra a linha tumoral da leucemia²⁴.

O TM34 exibiu a capacidade de se ligar à albumina, evidenciando a existência de um possível transporte na corrente sanguínea por esta proteína, e mais importante, a ligação a proteínas, particularmente à albumina sérica humana (HSA)²⁶. A Albumina sérica humana é o veículo de transporte não-específico mais importante no plasma sanguíneo, que apresenta uma extraordinária habilidade para se ligar a compostos metabólicos endógenos e a fármacos terapêuticos exógenos²⁴. No entanto, este composto apresenta como principal limitação, toxicidade *in vivo* em ratinhos nude.

Foi então adotada uma estratégia de síntese através da introdução de ligandos N,O-heteroaromáticos, que apresentam outras possibilidades de coordenação além do azoto. Surge assim uma nova família de compostos catiónicos, que apresentam uma boa estabilidade ao ar e humidade e excelentes propriedades citotóxicas contra diversas linhas celulares humanas. Deste grupo de compostos, destaca-se o complexo catiónico $[Ru(\eta^5-C_5H_5)(PPh_3)(C_{12}H_9NO)][CF_3SO_3]$, denominado TM90 (Fig. 10), que mostrou ter uma elevada atividade antitumoral em relação à cisplatina²⁷. Os resultados foram muito satisfatórios, mostrando uma atividade citotóxica excecional em várias linhas celulares, em especial para as linhas celulares resistentes à cisplatina. Além disso, evidenciou a existência de outras propriedades muito interessantes, como:

- ✓ Existência de interação com a albumina sérica humana (HSA)²⁷;
- ✓ Não é tóxica *in vivo*²⁷;
- ✓ O tumor diminui cerca de 50% em relação aos tumores dos ratinhos controlo²⁷;
- ✓ Previne o aparecimento de metástases em ratinhos nude²⁷.

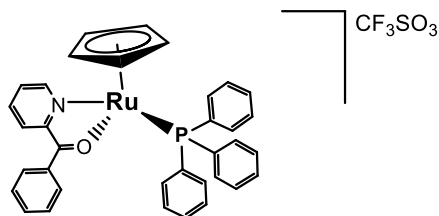


Figura 10 - Fórmula estrutural do TM90²⁷

1.3.4. Complexos poliméricos de rutênio

O desenvolvimento de agentes terapêuticos tem constituído o objetivo primordial dos investigadores, e a sua principal preocupação assenta na falta de seletividade dos compostos para as células tumorais, causando elevados efeitos secundários. A pesquisa tem-se centrado no design de fármacos cuja ação incida sobre as células anómalas sem afetar as células saudáveis. Neste âmbito, a libertação controlada de fármacos e a sua eficiência é considerada vital para combater com êxito os tumores. Alguns progressos têm sido efetuados conciliando a química de coordenação com a polimerização controlada, na procura de novas terapias e do aumento da seletividade dos fármacos, dando início a uma nova família de compostos, os complexos poliméricos metálicos (PMCs)²⁸.

Neste campo, é fundamental ter em consideração e tirar partido do efeito EPR “Enhanced Permeation and Retention” ou “Permeação e Retenção Melhorada” que consiste na acumulação passiva de macromoléculas e nanopartículas em tumores sólidos, aumentando a seletividade, o índice terapêutico e diminuindo os efeitos secundários. Este efeito é transversal a todas as macromoléculas²⁸. Os principais benefícios dos PMCs em relação ao complexo metálico não-polimérico são:

- ✓ Acumulação preferencial do fármaco no tumor através do transporte passivo- efeito EPR (Fig. 11);
- ✓ Diminuição da toxicidade;
- ✓ Capacidade de solubilização em fluidos biológicos de compostos de baixo peso molecular insolúveis;
- ✓ Capacidade de ultrapassar alguns mecanismos de resistência ao fármaco;
- ✓ Capacidade de induzir efeitos imunoestimuladores;
- ✓ Estabilização e prolongamento do tempo de meia-vida das drogas de baixo peso molecular ou proteínas²⁸.

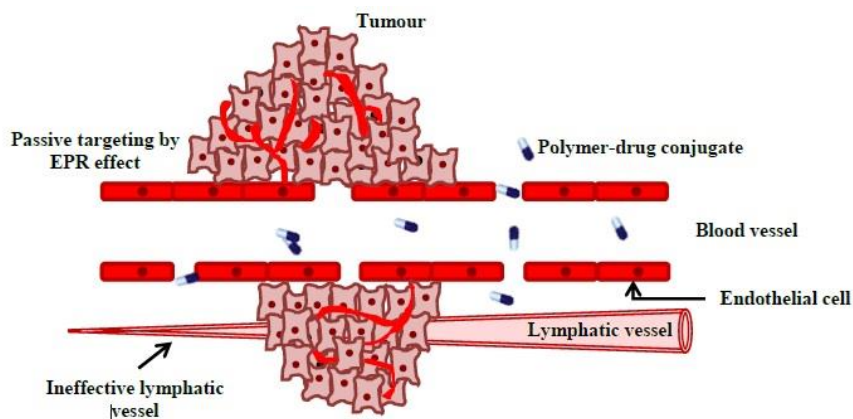


Figura 11 - Representação esquemática do efeito EPR²⁸

O Grupo de Química Organometálica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, tem vindo a contribuir durante os últimos anos para esta nova família de compostos, os PMCs. Em 2013, foi sintetizado o primeiro Ru-PMC (Fig. 12), constituído pelo fragmento Ru^{II}-ciclopentadienilo, 2 cadeias poliméricas de polilactídeo (PLA) e na região terminal das cadeias poliméricas foram inseridas duas moléculas derivadas da glucose, [Ru^{II}(η^5 -C₅H₅)(PPh₃)(mHBL)][CF₃SO₃] (mHBL = macroligando bidentado heteroaromático)²⁹. O polímero PLA foi escolhido, por ser biocompatível e não tóxico para o organismo humano. Este PMC apresenta-se como um possível candidato viável a fármaco, uma vez que os resultados obtidos são muito promissores, evidenciando ser mais ativo do que os complexos de platina e ruténio referidos anteriormente²⁹.

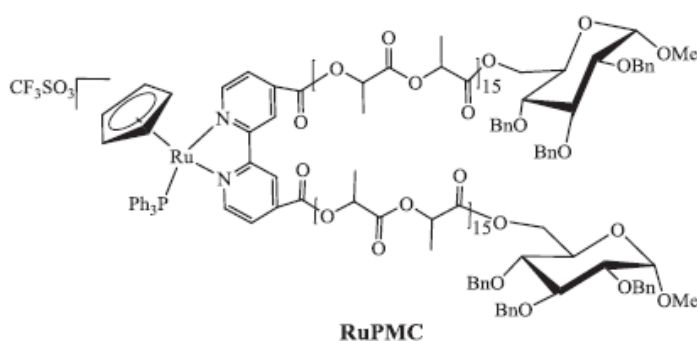


Figura 12- Representação estrutural do primeiro RuPMC²⁹

O efeito EPR pode permitir uma melhor internalização dos PMCs relativamente aos análogos de baixo peso molecular nas células tumorais devido à estrutura vascular defeituosa dos vasos sanguíneos do tumor que são permeáveis a macromoléculas, e assim criar uma sinergia apropriada para a entrega desta família de compostos e uma acumulação do fármaco nos tecidos tumorais elevada²⁹.

1.4. Enquadramento do presente trabalho

A escolha dos complexos organometálicos de ruténio com o fragmento “Ru-Cp” no tratamento dos adenomas da hipófise, como tema para a realização do presente trabalho teve em consideração diversas razões, entre as quais se destacam os resultados existentes na literatura referentes ao fragmento “Ru-Cp” (referido no tópico 3.2.1.) e os resultados obtidos relativos aos Complexos Metálicos Poliméricos (Tópico 3.2.2.) em trabalhos realizados no grupo de Química Organometálica e Catálise.

Assim este trabalho tem como objetivo a síntese e caracterização de novos complexos de ruténio e avaliação das suas atividades citotóxicas em linhas celulares com características distintas.

Capítulo 2

Síntese e caracterização do Polímero

Capítulo 2: Síntese e Caracterização do Polímero

2.1. Introdução

A descoberta do efeito EPR (Permeação e retenção melhorada) há 100 anos atrás em simultâneo com a descoberta da capacidade de acumulação passiva das macromoléculas, preferencialmente, nos tumores sólidos relativamente às células saudáveis foi um marco importante no campo da nanomedicina. Estas observações levaram ao desenvolvimento de novas formulações no combate de tumores, com base no efeito EPR²⁸. Neste contexto, surgiu, em 1970, o uso de polímeros como meio de transporte. Desde então, os poliésteres têm sido extensivamente estudados para a entrega controlada de fármacos, entre eles, destaca-se o polilactídeo que tem sido investigado para a entrega controlada de fármacos antimaláricos, contraceptivos, entre outros³⁰.

O polilactídeo é um poliéster alifático biodegradável e biocompatível, e por isso, a sua introdução no organismo não constitui qualquer problema, uma vez que não é tóxico. Além disso, o polilactídeo é facilmente inserido em complexos metálicos, tirando partido das suas propriedades e das propriedades do fragmento metálico, que converge no aumento da seletividade, do índice terapêutico e na diminuição dos efeitos secundários. O Grupo de Química Organometálica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, onde este trabalho foi desenvolvido, tem investido neste campo e publicou recentemente resultados promissores do primeiro Ru-PMC, que contém duas cadeias poliméricas de PLA na sua esfera de coordenação, que conferiu uma melhor internalização do complexo de ruténio nas células tumorais²⁹.

O polilactídeo, no seio do organismo, sofre degradação hidrolítica, formando ácido láctico que, por sua vez será metabolizado pela via do ácido tricarboxílico e eliminado como CO₂ pelo sistema respiratório. O polímero é completamente absorvido pelo sistema, provocando nenhuma ou uma leve e transitória reação adversa ao tecido³⁰. Assim, o polilactídeo constitui uma abordagem com um futuro promissor na entrega controlada de fármacos.

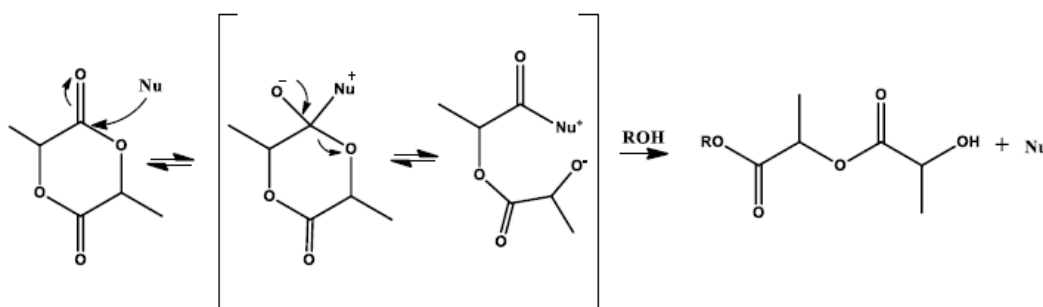
2.2. Polimerização por abertura de ciclo

A polimerização por abertura de ciclo, mais conhecida por ROP (do inglês *Ring Opening Polymerization*), é o método mais utilizado na síntese de materiais bem definidos e, comparativamente a outros métodos, é também o que permite o maior controle da sequência de monómeros, assim como do grupo terminal da cadeia polimérica. É muito utilizado na síntese de poliésteres alifáticos, como é o caso do PLA. A ROP requer a utilização de um catalisador

adequado para que a reação ocorra em condições adequadas e originar polímeros com propriedades controladas. A ROP pode prosseguir por diferentes tipos de mecanismos, tais como, aniônico, de coordenação-inserção e catiónico via monómero ativado, dependendo do catalisador e/ou iniciador escolhido. O PLA sintetizado no decorrer do capítulo seguinte foi formado através do mecanismo catiónico via monómero ativado.

2.2.1. Polimerização catiónica via monómero ativado

Neste tipo de polimerização, ocorre a formação de uma espécie carregada positivamente, que é subsequentemente atacada pelo monómero, Esquema. 1. Este ataque nucleofílico, do tipo S_N2 , resulta na abertura do anel. Esta polimerização difere dos restantes mecanismos de polimerização, uma vez que o catalisador nucleofílico somente ativa o monómero possibilitando a abertura do ciclo, enquanto que nos restantes os catalisadores/iniciadores ativam o monómero e iniciam a polimerização, permanecendo ligados à cadeia polimérica durante o processo de propagação.



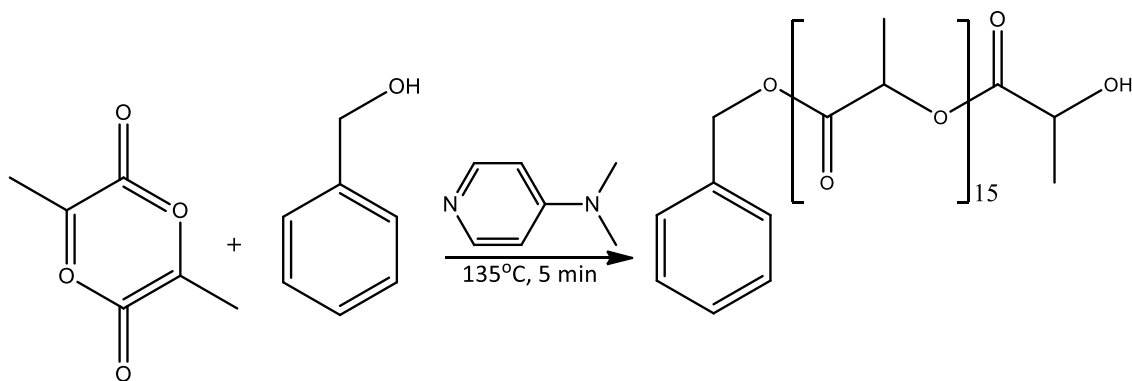
Esquema 1 – Mecanismo de polimerização do PLA

2.3. Síntese do Polímero Polilactídeo

A escolha do polilactídeo teve por base as propriedades mencionadas anteriormente, e principalmente por não ser tóxico para o organismo. A ROP do D,L-Lactídeo foi realizada usando como catalisador a 4-dimetilaminopiridina (DMAP) que atua como nucleófilo e o álcool benzílico como iniciador da polimerização.

Para esta polimerização pretendia-se uma razão monómero/iniciador (D,L-Lactídeo/Álcool benzílico) igual a 15, ou seja, 15 unidades de D,L-Lactídeo para cada molécula de álcool benzílico. A polimerização foi realizada a 135°C durante 5 minutos (Esquema 2). Após decorrido esse tempo fez-se o *quench* da reação, ou seja, parou-se a polimerização utilizando algumas gotas de uma solução 50/50 % (v/v) de água e metanol. De seguida, dissolveu-se o polímero em diclorometano, adicionou-se todo o conteúdo ao balão contendo a solução anteriormente mencionada e levou-se ao evaporador rotativo para que o polímero precipitasse.

Por fim, lavou-se o polímero com éter etílico para remover os vestígios de DMAP que pudessem existir e secou-se o polímero a vácuo.



Esquema 2 – Esquema da polimerização do álcool benzílico com o PLA

2.4. Caracterização do Polímero

2.4.1. Espectroscopia de ^1H -RMN e determinação da massa molecular

O polilactídeo foi caracterizado por espectroscopia de ^1H RMN, através do qual, Fig. 13, foi possível identificar com facilidade os sinais correspondentes à cadeia do polilactídeo (H_5 , $\text{H}_{5'}$, H_6 e H_6') e também os sinais correspondentes ao anel aromático do iniciador, álcool benzílico, ($\text{H}_1+\text{H}_2+\text{H}_3$). O sinal correspondente ao próton H_4 aparece sobreposto com os prótons H_5 da cadeia principal. Verifica-se também a existência de vestígios de éter etílico. O espectro de ^1H RMN permite-nos concluir que o ligando foi sintetizado com sucesso, com um rendimento de 78%, embora o DP do polímero esteja ligeiramente abaixo do pretendido ($\text{DP}_{\text{teórico}}=15$). Contudo, tendo em consideração que o rendimento da reação foi inferior a 100%, podemos inferir que o valor do $\text{DP}_{\text{experimental}}$ está concordante com o $\text{DP}_{\text{teórico}}$ calculado em função do rendimento da reação de acordo com a seguinte equação:

$$\text{DP}_{\text{teórico}} = \frac{\frac{n_{\text{monómero}}}{n_{\text{iniciador}}} \times \eta}{100} = \frac{\frac{0.00697}{0.00046} \times 78}{100} = 11.8 \approx 12$$

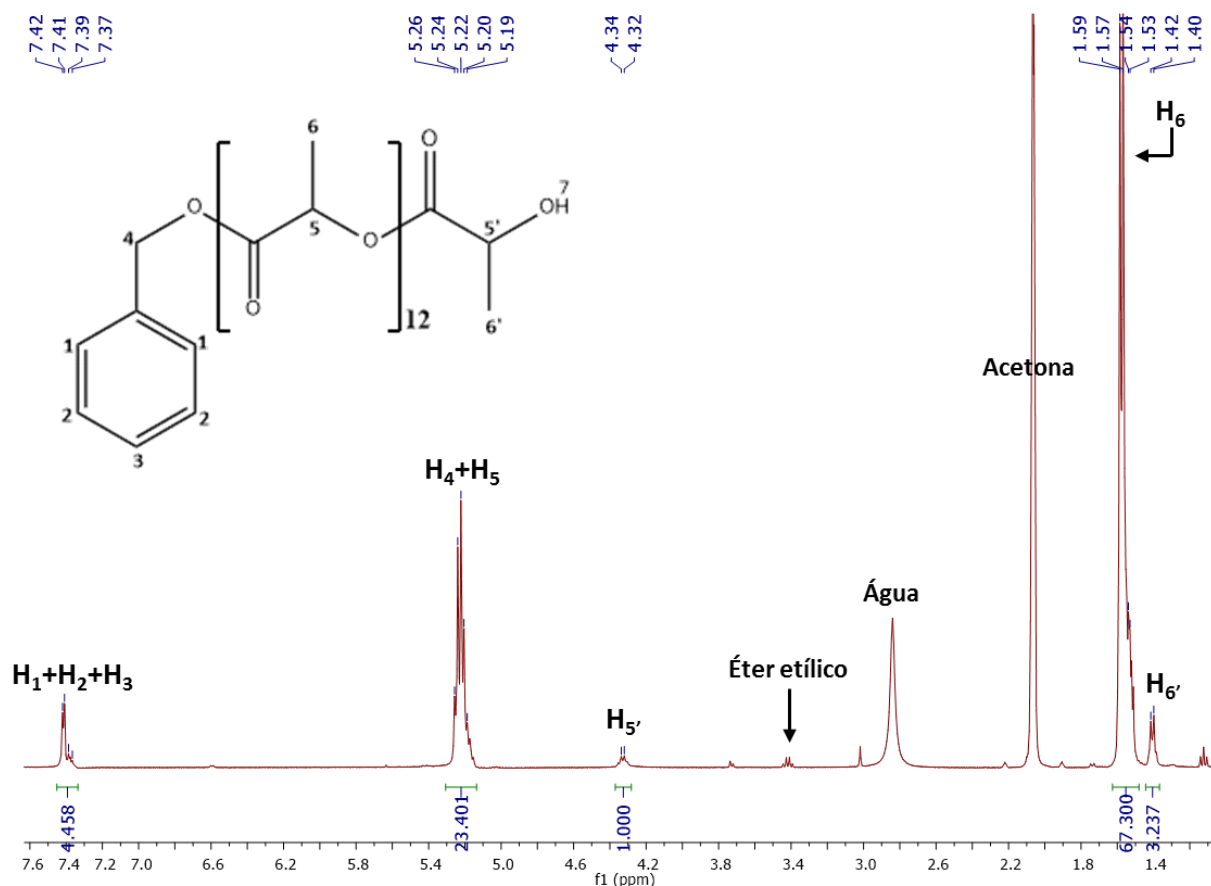


Figura 13 – Espectro de ^1H RMN do PLA em acetona- d_6

2.4.1.1. Determinação do Grau de Polimerização

Os polímeros são macromoléculas que são constituídas por unidades de repetição, designadas por monómeros. A massa molecular do polímero representa a distribuição média das moléculas que o constituem, e a sua determinação é essencial para a análise do polímero. Existem várias técnicas para a determinação da massa molecular de polímeros, das quais se destaca a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) que é a técnica mais simples para a determinação do grau de polimerização (DP). No entanto, para a utilização desta técnica tem que se ter a certeza de que não ocorrem reações secundárias (como por exemplo a formação de ciclos) que poderiam interferir com a análise. Neste caso em particular, é já do conhecimento do laboratório de Química Organometálica que estas polimerizações ocorrem sem formação de produtos secundários. Desta forma, através do ^1H -RMN é possível calcular o grau de polimerização médio do polilactídeo, pois a área dos sinais no espectro é proporcional à concentração molar da espécie na amostra. O cálculo do **DP** é feito através da razão entre o valor da integração dos sinais de H_5 e $\text{H}_{5'}$, de acordo com a seguinte relação:

$$DP = \frac{\frac{H_5 + H_{5'}}{H_{5'}}}{2} = \frac{\frac{23.40 + 1.00}{1.00}}{2} = 12$$

Deste modo, sabendo o número de unidades de repetição do monómero, é então possível calcular a massa molecular aproximada do polilactídeo, de acordo com a seguinte expressão:

$$MM_{PLA} = (DP \times MM_{lactídeo}) + MM_{álcoolbenzílico}$$

Onde MM corresponde à massa molecular.

$$M_{PLA} = (12 \times 144.13) + 108.14 = 1837.77 \text{ g mol}^{-1}$$

Logo, a massa molecular do polilactídeo é aproximadamente $1837.77 \text{ g mol}^{-1}$, com um DP igual a 12 unidades de Lactídeo.

Capítulo 3

Síntese e Caracterização dos Complexos Organometálicos

Capítulo 3: Síntese e Caracterização dos Complexos Organometálicos

3.1. Introdução

Nos últimos anos, o interesse pelos derivados do $\text{Ru}(\eta^6\text{-areno})$ têm aumentado exponencialmente, devido aos excelentes resultados demonstrados a nível da atividade anticancerígena. Os complexos organometálicos com base no fragmento “Ru-Cp” também têm despertado um especial interesse devido à sua elevada atividade citotóxica em várias linhas celulares e aos resultados promissores que têm revelado.

Os complexos de ruténio de forma geral $[\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{L})_2\text{X}]$ ($\text{L} = \text{PPh}_3$, e $\text{X} = \text{Cl}$, Br , etc) têm sido extensivamente estudados por *Bruce et al.*³¹. Um exemplo, deste tipo de complexos é o novo complexo $[\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_6)_2\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH})_2\text{Cl}]$ (**1**) sintetizado durante o desenvolver deste trabalho e usado como composto de partida para as sínteses seguintes. Este complexo apresenta uma grande facilidade na substituição dos seus ligandos.

Neste capítulo são apresentados estudos das reações a partir do complexo de ruténio, $[\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_6)_2\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH})_2\text{Cl}]$ com o ligando 2-benzoílopiridina e posterior funcionalização com o polímero polilactídeo. O ligando 2-benzoílopiridina, ligando bidentado heteroaromático (N,O), foi escolhido para este trabalho tendo em conta os excelentes resultados já obtidos no grupo com ligandos bidentados heteroaromáticos (N,O). O uso do polilactídeo teve o intuito de aumentar a seletividade através do uso de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, tendo em mente os resultados promissores obtidos com o primeiro Ru-PMC sintetizado pelo Grupo de Química Organometálica.

3.2. Síntese dos complexos organometálicos

3.2.1. Síntese do complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_6)_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH})_2\text{Cl}]$ (**1**)

O composto de partida foi resultado da reação entre o tricloreto de ruténio hidratado ($\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$), o ciclopentadienilo recém-destilado e o ácido 4-(difenilfosfino)benzóico, em excesso (1:2.5), em metanol, a refluxo durante 14 horas na presença de peneiros moleculares. Os peneiros moleculares foram usados para reter nos seus interstícios a água, uma vez que o solvente da reação não foi seco, e por se ter verificado que a água existente no solvente interferia com a reação, levando à formação de um subproduto. O produto resultante é lavado com diclorometano, solvente no qual o subproduto é solúvel, e éter etílico para remover o ácido 4-(difenilfosfino)benzóico adicionado em excesso e seco a vácuo. Obteve-se no final um produto amarelo com um rendimento de 49.2%.

3.2.2. Síntese do complexo



A síntese deste complexo foi feita partindo do $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_6)_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH})_2)\text{Cl}]$. Este composto é dissolvido em metanol, adicionou-se uma porção de peneiros moleculares em pó e juntou-se triflato de prata (AgCF_3SO_3) em excesso (1:1.5) e deixou-se sob agitação durante 1 hora à temperatura ambiente, tendo o cuidado de proteger a solução da luz. Ocorreu a formação de um precipitado de cor cinzenta, AgCl (s), por abstração do ião cloreto pelo AgCF_3SO_3 . Seguidamente, adicionou-se o ligando 2-benzoílopiridina ligeiramente em excesso (1:1.1) e a mistura foi levada a refluxo durante 5 horas. Após o refluxo, a solução é filtrada para remoção do precipitado AgCl (s) e dos peneiros moleculares. A solução é levada à secar e o produto resultante purificado através de cromatografia preparativa ou recristalizado por difusão lenta de solventes com diclorometano/*n*-hexano. Durante a reação verificou-se a formação de um subproduto, de cor violeta, que não se conseguiu remover com as sucessivas recristalizações e, por isso, recorreu-se à cromatografia preparativa, onde se conseguiu uma boa separação das duas manchas violetas (correspondentes ao produto e subproduto da reação) e assim obteve-se o produto desejado, após recristalização por difusão lenta em diclorometano/*n*-hexano com um rendimento de 34%. Contudo, a purificação por cromatografia preparativa leva a perdas significativas de produto que se reflete no rendimento da reação, devido a algum produto ficar retido na sílica e não se conseguir extrair todo o produto.

Para otimizar a reação, optou-se por aumentar o tempo de refluxo. Neste caso, a quantidade de subproduto formado foi bastante inferior, e pode-se postular que as horas de refluxo a mais relativamente à primeira síntese podem levar a que o subproduto se converta no produto desejado e assim se consiga remover as impurezas existentes por recristalização por difusão lenta, não sendo necessário recorrer a cromatografia preparativa como procedimento adicional de purificação. Neste caso, obtêm-se o produto desejado com um bom rendimento, cerca de 72%.

3.2.3. Síntese do complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_6)_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH})((\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO})\text{-}(\text{poli-LA-OC}_7\text{H}_7))][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ (3)

O complexo (3) foi obtido a partir do complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_6)_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}))_2(\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO})][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ (2). Dissolveu-se o polilactídeo em THF seco e adiciona-se a base Et_3N em excesso (1:2), e deixa-se em agitação à temperatura ambiente durante 1 hora. A base trietilamina desprotona o grupo terminal hidroxilo do polilactídeo. Após 1 hora, adiciona-se o complexo (2), em excesso (1:1.5) e a reação prossegue à temperatura de refluxo do THF até remoção completa da água formada ao longo da reação usando uma montagem Dean-Stark. A água que se forma deve-se à ocorrência de uma reação de

transesterificação, que ocorre entre o polímero desprotonado e o carbono do grupo carboxílico do fosfano. O produto resultante foi recristalizado por difusão lenta de solventes em diclorometano/*n*-hexano tendo-se obtido um produto de cor violeta com um rendimento de x 56%

Os complexos sintetizados foram caracterizados por análise elementar (1 e 2) e técnicas espectroscópicas, RMN (^1H , ^{13}C e ^{31}P , assim como técnicas bidimensionais), IV e UV-Vis. O composto 3 foi adicionalmente caracterizado por cromatografia de permeação em gel.

3.2.1.1. Análise Elementar

Os valores teóricos apresentados foram calculados na presença de uma molécula de solvente, diclorometano, pode-se verificar, através da tabela 2, que os valores são concordantes e pode-se inferir que o composto foi sintetizado com sucesso.

Tabela 2 – Análise elementar do complexo (1)

Complexo (1)	% C	% H
$\text{C}_{43}\text{ClO}_4\text{P}_2\text{Ru}\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$	59.4 (58.7)	4.10 (4.15)

Os resultados da obtidos através da análise elementar, para o complexo (2), tabela 3, também não foram completamente concordantes com os valores teóricos. Estes resultados podem também estar relacionados com o composto não estar devidamente seco, embora tenha sido seco durante 1 noite sobre vácuo a 60°C. Também pode ter ocorrido a degradação do complexo com a temperatura ou com a presença de sais inorgânicos como o AgCl.

Tabela 3 – Análise elementar do complexo (2)

Complexo (2)	% C	% H	% N	% S
$\text{C}_{39}\text{H}_{35}\text{F}_3\text{NO}_6\text{PRuS}\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$	48.6 (49.2)	3.40 (3.91)	1.20 (1.39)	4.00 (3.19)

3.2.1.2. Espectroscopia de RMN dos complexos

A interpretação dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C , ^{31}P , assim como as técnicas bidimensionais, COSY, HMBC e HMQC foi realizadas para todos os complexos. As experiências foram realizadas em dimetilsulfóxido deuterado para o complexo (1), metanol deuterado para o complexo (2) e acetona deuterada no caso do complexo (3).

Os resultados obtidos por RMN ^1H para o complexo **(1)** e para o ligando ácido 4-(difenilfosfino)benzóico encontram-se representados na Fig. 14. Os valores dos desvios químicos do fósforo (RMN ^{31}P) para o complexo e o ligando livre encontram-se representados na tabela 4.

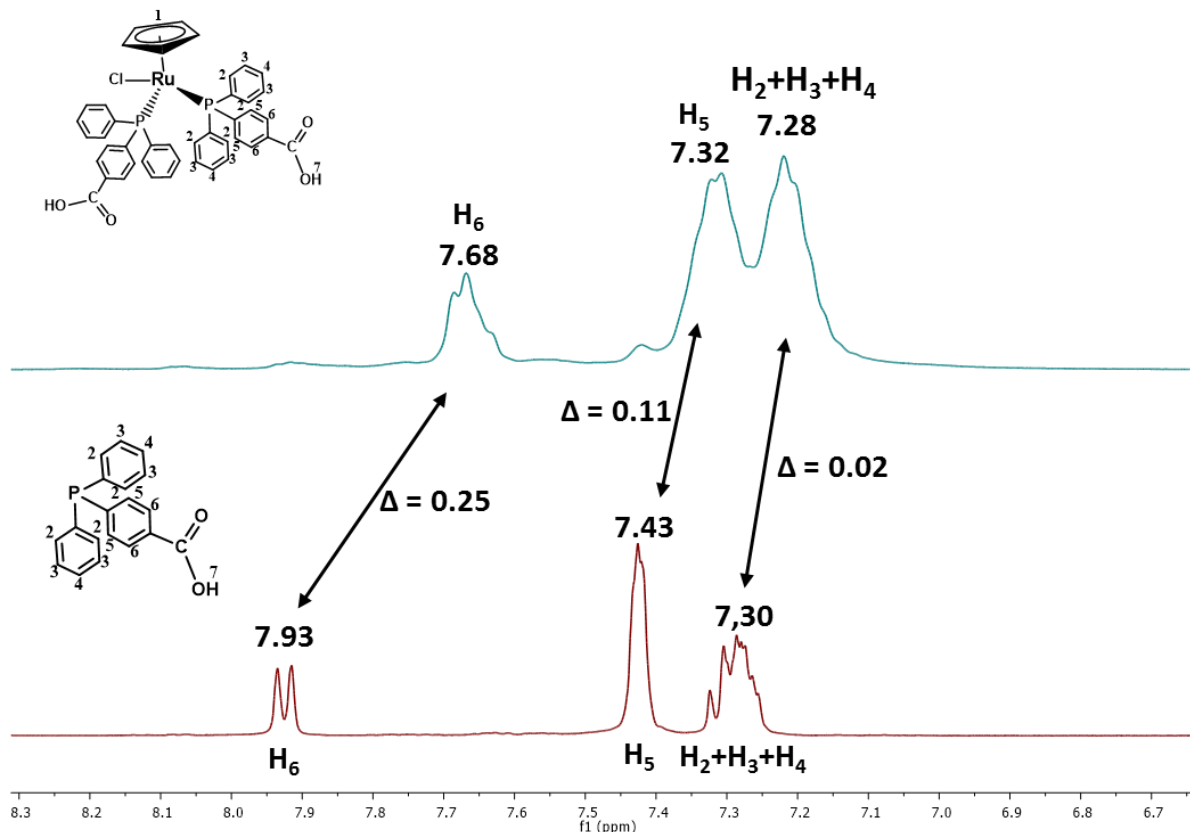


Figura 14 – Espetro ^1H RMN do complexo **(1)** (cima) e do ligando fosfano livre (baixo) em acetona d_6 e respectivos desvios químicos assim como a diferença entre os desvios químicos do fosfano livre e quando coordenado

Foi possível fazer a atribuição de todos os picos, em relação aos desvios químicos no espectro de ^1H RMN verifica-se que os sinais H_6 e H_5 blindaram após a coordenação ao metal e os prótons $\text{H}_2+\text{H}_3+\text{H}_4$ sofreram uma ligeira desblindagem em relação ao fosfano livre. A natureza dos ligandos que estão coordenados ao centro metálico, rutênio, têm influencia sobre todo o complexo. O ligando fosfano é um doador σ e um fraco aceitador π . Contudo, neste complexo temos também o ligando cloreto, que é um bom doador σ e π e o ciclopentadienilo, a 4.11 ppm, que além de aceitador π é doador σ . Assim, o metal recebe densidade eletrônica de todos os ligandos coordenados que resulta num excesso de elétrons levando a que ocorra retrodoação não só para o ciclopentadienilo mas também para a fosfina, e por isso, verifica-se a blindagem dos sinais H_6 e H_5 prótons que sentem mais este efeito devido à presença do grupo ($p\text{-COOH}$), que é um aceitador de elétrons.

Tabela 4 - Valores de desvio químico do espectro ^{31}P para o complexo **(1)** e respectivo fosfano livre e para o complexo $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ e respectivo fosfano livre

Composoto	δ / ppm
$[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$	38.8
Complexo (1)	39.4
PPh_3	- 5.16
$[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_6)_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH})]$	- 5.24

Através dos dados presentes na tabela 4 verifica-se a existência de uma grande desblindagem do sinal do ligando fosfano livre em relação ao complexo **(1)**, uma diferença de cerca de 44.4 ppm, o que nos indica que ocorreu a coordenação do ligando ao centro metálico, confirmando assim os resultados obtidos por RMN ^1H . O mesmo verifica-se na síntese do complexo $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$, onde o trifenilfosfano sofre uma grande desblindagem, de aproximadamente 44 ppm, ao coordenar-se ao centro metálico, o que comprova a coordenação do ligando ao rutênio.

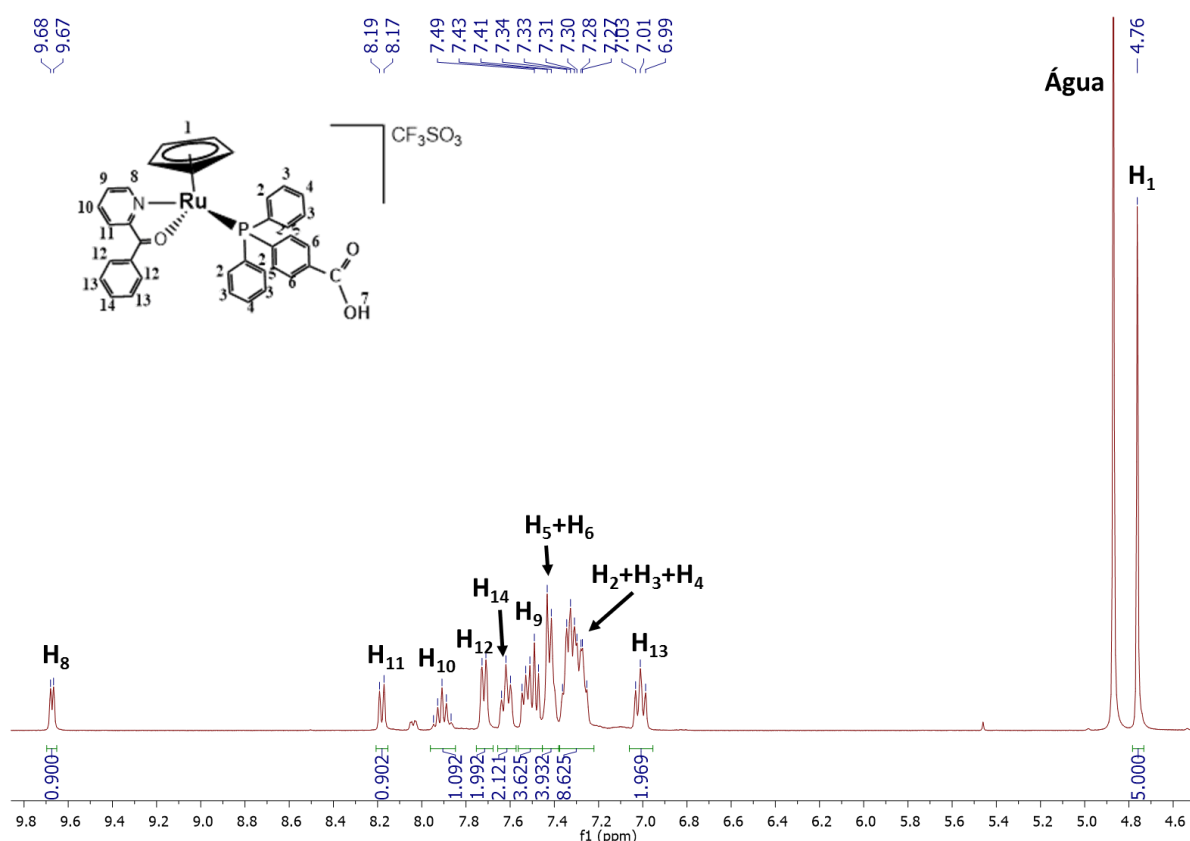


Figura 15 - Espectro ^1H RMN do complexo **(2)** em metanol- d_4

Através do espectro ^1H RMN, Fig. 15, foi possível fazer a atribuição de todos os prótons. Verifica-se que o sinal correspondente ao ciclopentadienilo (4.76 ppm) sofreu uma grande desblindagem em relação ao composto de partida. Essa diferença é de aproximadamente 0.86

ppm em acetona-d₆, sendo perceptível a existência de retrodoação do ciclopentadienilo para o rutênio. A introdução do ligando heteroaromático, em que o azoto é um doador σ e o oxigênio um doador σ e aceitador π , ou seja, a substituição do ligando cloreto e do fosfano por este ligando leva a que ocorra doação de densidade eletrônica para o rutênio, mas também retrodoação do metal para átomo de oxigênio do ligando aromático. Este efeito pode ser observado pela forte desblindagem do H₈, pertencente ao anel N-heteroaromático, quando comparado com o ligando livre. Este comportamento é típico de uma coordenação sigma do átomo de azoto. Pelo contrário, uma blindagem significativa é observada para os prótons localizados perto do átomo de oxigênio sugerindo que há um fluxo eletrônico do metal para o ligando através do átomo de oxigênio coordenado, assim como se observou no composto análogo TM90²⁷.

Contudo, em relação ao composto de partida existe maior doação do ciclopentadienilo para o rutênio no complexo **(2)** do que no complexo **(1)**, devido à existência do átomo de oxigênio no ligando heteroaromático que atrai a densidade eletrônica.

Relativamente ao complexo **(3)**, através do espectro ¹H RMN, Fig. 16, foi possível identificar os sinais relativos à cadeia principal do PLA (H₇, H₈, H_{7'} e H_{8'}) assim como os sinais do PLA.

Tabela 5 – Valores de desvios químicos do espectro ¹H RMN para o PLA e complexo (3)

Composto	δ / ppm			
PLA	5.20	4.31	1.55	1.39
Complexo (3)	5.20	4.32	1.55	1.39

Verificou-se que a funcionalização do complexo com o polímero PLA não afetou os sinais no espectro de ¹H RMN relativos ao polímero, apresentado os mesmos valores de desvio químico antes e após a funcionalização, tabela 5, estando de acordo com o esperado.

Os complexos **(2)** e **(3)** apenas diferem na existência de um braço polimérico de PLA no complexo **(3)**, foi possível fazer a atribuição dos sinais. Podemos observar que o ciclopentadienilo sofre uma pequena desblindagem do complexo **(2)** para o complexo **(3)**. A funcionalização do grupo fenilo da fosfina com o polímero PLA, que possui vários átomos de oxigênio, que podem puxar a densidade eletrônica para si, levando a que a fosfina que é uma doadora σ , não doe tantos elétrons para o rutênio como se verifica no complexo **(2)**. Consequentemente, não existe tanta doação do ciclopentadienilo para o metal levando a que ocorra a desblindagem do ciclopentadienilo, que desblinda aproximadamente 0.46 ppm. Os prótons aromáticos do ligando e do fosfano aparecem entre 9.90 – 7.30 ppm, verificando-se que

os prótons aromáticos e, mais significativamente, o próton H₁₃ (complexo **(3)**) desblindam comparativamente ao seu homólogo no complexo **(2)** (correspondente próton H₈, no complexo **(2)**).

3.2.1.2.1. Cálculo teórico da massa molecular do complexo (3)

Como foi referido anteriormente, a técnica de RMN permite-nos estimar a massa molecular dos complexos organometálicos poliméricos. Desta forma, através do espectro ¹H RMN, Fig. 16, calculou-se a massa molecular do complexo **(3)**.

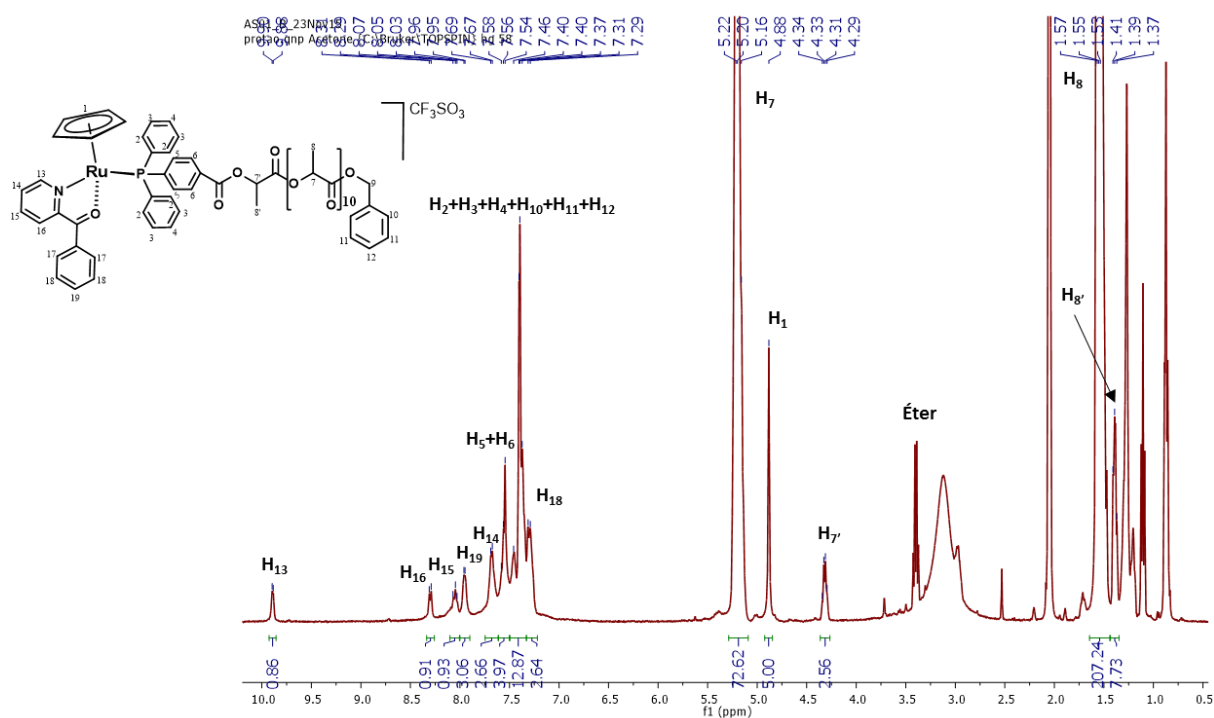


Figura 16 – Espectro ¹H RMN relativo ao complexo **(3)**

Com base na seguinte equação, é possível calcular a massa molecular do composto:

$$MM_{\text{complexo(3)}} = [(DP \times MM_{\text{lactídeo}}) + MM_{\text{complexo}} + MM_{\text{álcoolbenzílico}}] - H_2O$$

O DP do polímero é calculado da mesma forma que a exemplificada para o polímero polilactídeo:

$$DP = \frac{H_7 + H_{7'}}{2} = \frac{72.62 + 2.56}{2} = 14.7 = 15$$

$$MM_{\text{complexo(3)}} = [(15 \times 144.13) + 834.80 + 107.14 - 18] = 3085.89 \text{ g mol}^{-1}$$

É necessário ter em conta no cálculo da massa molecular, que se forma uma molécula de água durante o processo de funcionalização, resultante da desprotonação do polímero e da

saída do grupo hidroxilo do grupo carboxílico do ligando fosfano. Assim, a massa molecular do PMC sintetizado é $3085.89 \text{ g mol}^{-1}$, com um DP igual a 15 unidades de Lactídeo.

3.2.1.3. Espectroscopia de UV-Vis dos complexos

A espectroscopia de UV-Visível é uma técnica de caracterização que permite identificar bandas de transição eletrônicas, tais como, as bandas de transferência de carga entre o metal e os ligandos (MLCT: bandas de transferência de carga do metal para o ligando e LMCT: bandas de transferência de carga do ligando para o metal), transições $d \rightarrow d$ e as bandas de transferência do ligando ($\pi \rightarrow \pi^*$; $n \rightarrow \pi^*$; $n \rightarrow \sigma^*$). O comportamento dos compostos em solução na região do UV-Visível pode variar consoante o solvente utilizado. O efeito mais notório desta influência é designado por solvatacristo, que é caracterizado por alterações nas bandas de absorção características (posição, intensidade e forma) quando se altera a polaridade do solvente. É desta forma que muitas vezes é possível distinguir as bandas de transferência de carga das bandas de transferência do ligando ($\pi \rightarrow \pi^*$), uma vez que só as bandas de transferência de carga sofrem as alterações referidas^{32,33}.

Os espectros de absorção de UV-Vis dos complexos foram realizados em diclorometano (2,3), dimetilsulfóxido (1-3) ou em metanol (1), e no geral foram usadas concentrações de 10^{-4} a 10^{-5} M .

Desta forma, foram traçados os espectros eletrônicos de todos os complexos em diferentes solventes. Apresentam-se nas figuras 17 e 18 os espectros eletrônicos dos complexos sintetizados.

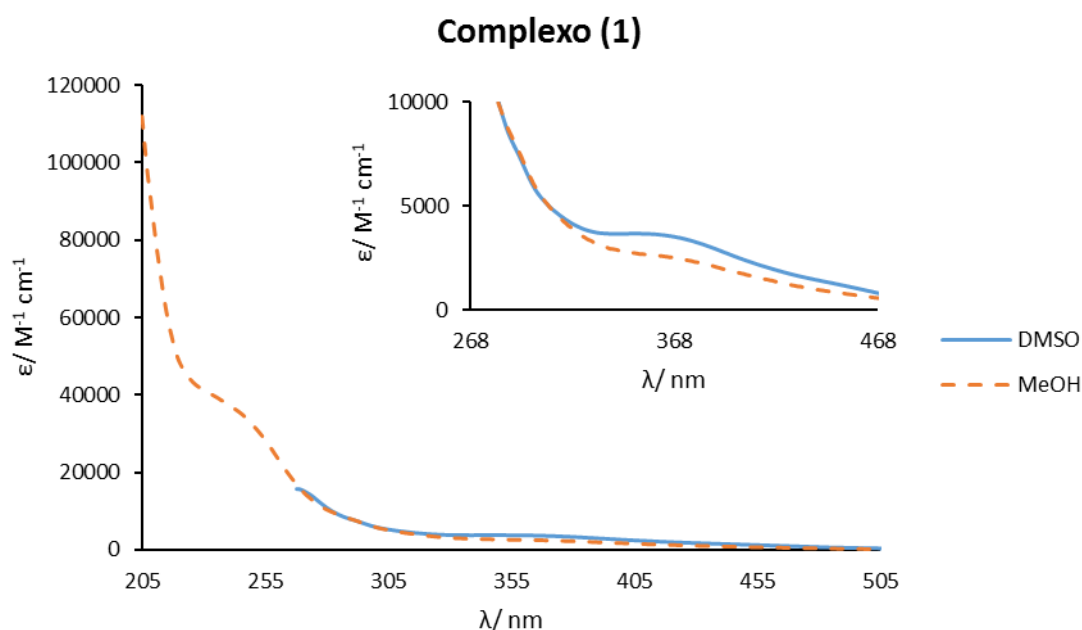


Figura 17 – Espectro eletrónico do complexo (1) em DMSO e Metanol

Na figura 17, podemos observar a existência de uma banda mais intensa a 235-255 nm (em MeOH) que é atribuída a transições eletrônicas do fragmento metálico $[\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_6)_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}))_2]^+$. Também é possível observar a existência de um deslocamento hipsocrômico da banda de absorção a $\lambda = 348$ nm (em DMSO), que nos permite concluir que estamos perante a existência de uma banda de transferência de carga ligando \rightarrow metal tendo em consideração a doação de densidade eletrônica da fosfina e do ciclopentadienilo, além do ligando cloreto para o metal. Contudo também ocorre retrodoação do rutênio para o ciclopentadienilo, embora não se verifique a existência dessa banda no espectro UV-vis. É de realçar que este tipo de bandas, normalmente, apresenta valores de absorvidade molar superior a $500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, o que se verifica neste caso.

Na figura 18, encontra-se representados os espectros eletrônicos dos complexos **(2)** e **(3)** em diclorometano. É possível verificar que não existem diferenças significativas nos espectros dos dois complexos. As bandas mais intensas entre 235-290 nm são atribuídas à banda de transferência de carga ligando \rightarrow meta, que comparando com o espectro eletrónico do complexo **(1)** sofre um deslocamento hipsocrômico. As bandas a $\lambda = 529$ nm são bandas de transferência de carga ligando \rightarrow metal, devido à natureza doadora dos ligandos coordenados. Contudo verifica-se a existência de um ombro, que se encontra assinalado, na figura 18, com uma seta, que pode ser uma banda de transferência de carga metal \rightarrow ligando, proveniente da retrodoação do metal para o átomo de azoto do ligando heteroaromático.

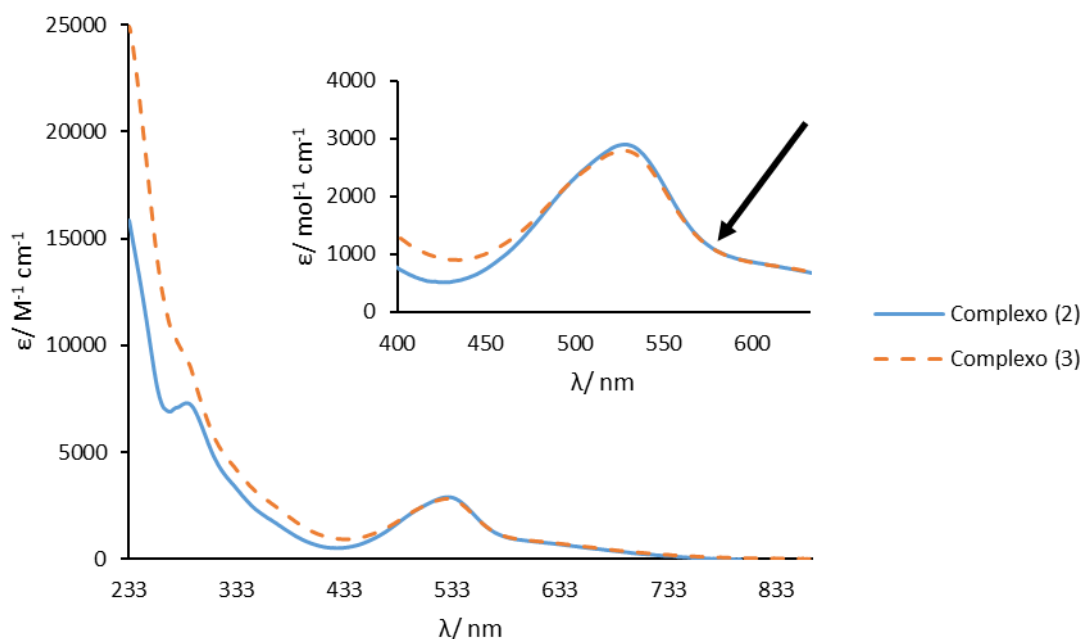


Figura 18 - Espectros eletrónicos dos complexos **(2)** e **(3)** em CH_2Cl_2

3.2.1.4. Espectroscopia de Infravermelho

O espectro de IV de um composto é essencialmente constituído pela sobreposição de bandas de absorção de grupos funcionais específicos, embora as subtis interações com os átomos vizinhos, da molécula, imponham o carácter da individualidade ao espectro de cada composto.

Através desta técnica de caracterização é possível identificar grupos funcionais presentes nos compostos. Com base numa análise qualitativa do espectro, em regiões de frequência específica para cada grupo funcional, é possível fazer a atribuição das bandas recorrendo a tabelas de absorção no infravermelho.

A tabela 6 reúne algumas das bandas mais características presentes nos espectros de IV dos complexos, (Anexo 1.1. a 1.3). Relativamente à banda O-H verifica-se que ocorre um deslocamento para números de onda mais baixos do complexo **(1)** para o complexo **(2)**, 3441 e 3431 cm^{-1} respetivamente. Nos complexos **(2)** e **(3)** observa-se a presença do contra-íão CF_3SO_3^- pelo aparecimento das bandas a 1261 e 1263 cm^{-1} , respetivamente. Também foi possível identificar nos três complexos a presença dos C-H aromáticos (3020-3000 cm^{-1}), assim como as duplas ligações C=C ($\approx 1600 \text{ cm}^{-1}$) e a ligação C-O (1320-1210 cm^{-1}).

Tabela 6 – Dados espectroscópicos de IV para os complexos sintetizados

IV/ cm^{-1}							
Complexos	$\nu\text{O-H}$	$\nu\text{C-H}$	$\nu\text{C=O}$	$\nu\text{C-O}$	$\nu\text{C=C}$	$\nu\text{C-N}$	$\nu\text{CF}_3\text{SO}_3$
(1)	3441	3053	1699	1298	1598	-	-
	1433	835					
(2)	3431	3057	-	1029	1595	1338	1261
		842					
(3)	-	808	1759	1095	1598	-	1263

3.3. Sínteses não conclusivas/ inconclusivas

3.3.1. Síntese do $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_6)_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}))_2(\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{NO})][\text{CF}_3\text{SO}_3]$

Este complexo foi obtido a partir de uma solução de $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_6)_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}))_2\text{Cl}]$ em metanol, ao qual se adicionou triflato de prata, em excesso (1:2,) e agitou-se durante 1 hora à temperatura ambiente. Neste primeiro passo da reação deu-se a abstração do íão cloreto pelo AgCF_3SO_3 , com a formação de um precipitado, AgCl (s). De

seguida, adicionou-se o ligando 1-fenilisoquinolinilacetona, em excesso (1:1.1), e a mistura foi levada a refluxo durante 4 horas. Após o refluxo, filtrou-se a solução de cor roxa para isolar o precipitado de prata da solução e levou-se a solução à secura. O precipitado roxo foi lavado três vezes com hexano anidro e foi recristalizado por difusão lenta de solventes com diclorometano/hexano, dando origem a um precipitado roxo. A síntese foi repetida nas mesmas condições, mas não se conseguiu obter o produto desejado. Resolveu-se tentar fazer a síntese na presença de peneiros moleculares, tendo-se verificado que neste caso a sua utilização levava à formação de um subproduto maioritário. Assim, por falta de tempo optou-se por não continuar com a síntese deste composto.

Através do espectro de ^1H RMN (Anexo 4.1), foi possível fazer a atribuição dos sinais aromáticos relativos ao ligando heteroaromático e do fosfano e também do ciclopentadienilo que apresenta um desvio químico de cerca de 5 ppm, que comparando com o seu valor no composto de partida (4.17 ppm, em acetona- d_6) sofreu um desblindagem de cerca de 0.83 ppm. Esta diferença permite-nos concluir que ocorreu a coordenação do ligando ao centro metálico. Além disso, no espectro de ^{31}P RMN (Anexo 4.2) observa-se a presença de um único pico a 49.01 ppm, que nos leva a concluir que a síntese foi bem sucedida. Contudo, a reação necessita de ser otimizada e estudada as melhores condições de síntese para que esta seja reprodutível.

3.3.2. PLA+ Temozolomida

A temozolomida foi um dos ligandos escolhidos para a síntese de compostos no âmbito desta tese por possuir atividade já conhecida e relevante contra tumores funcionais e não funcionais da hipófise³⁴, permitindo-nos obter desta forma complexos com um espectro de ação mais alargada. A temozolomida possui a capacidade de inibir o crescimento das células tumorais em qualquer fase do ciclo, tornando-se ideal para o tratamento de tumores pituitários com um crescimento lento³⁴.

A temozolomida, Fig. 19, possui um grupo nucleofílico prótico ($-\text{NH}_2$) capaz de dar início ao ROP³⁵. Portanto, tentou-se usar a temozolomida como iniciadora da polimerização do D,L-lactídeo (em vez de usar o álcool benzílico como foi descrito no capítulo 2).

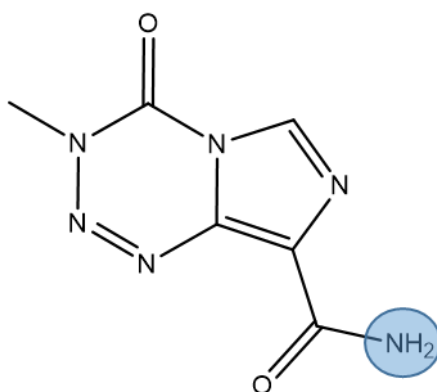


Figura 19 – Representação estrutural da temozolomida

Nesta polimerização pretendia-se uma razão monómero/iniciador (D,L-Lactídeo/Temozolomida) igual a 15, ou seja, 15 unidades de D,L-Lactídeo para cada molécula de temozolomida. A polimerização foi realizada a 135°C durante 15 minutos e utilizou-se o DMAP como catalisador da reação. Ao fim desse tempo, fez-se o *quench* da reação com algumas gotas de uma solução 50/50 % (v/v) de água e metanol, que serviu para cessar a reação de polimerização. De seguida, dissolveu-se o polímero em diclorometano e transferiu-se o mesmo para um balão contendo a solução mencionada anteriormente. Colocou-se o balão no evaporador rotativo para que o polímero precipitasse e evaporar parcialmente a solução. Lavou-se o polímero com éter etílico para remover vestígios de DMAP e D,L-Lactídeo que eventualmente não tivesse reagido e secou-se o polímero a vácuo durante uma noite.

O polímero foi caracterizado por ^1H RMN que nos permitiu concluir que a polimerização ocorreu, no entanto, comparando as integrações dos grupos terminais do polímero com os integrais correspondentes à temozolomida verificou-se que a funcionalização não foi de 100 % (nesse caso teríamos que ter uma razão entre os integrais de 1:1).

Seguiram-se outras abordagens de reação, tais como, aumentar o tempo de polimerização (20- 30 min e 24h), a utilização do dobro da quantidade de temozolomida, atuando como catalisador e iniciador da reação simultaneamente, alteração da temperatura de polimerização (100°C) e também a utilização do monómero L,L-Lactídeo. Contudo, os resultados permitiram chegar às mesmas conclusões anteriores e era evidente que a polimerização tinha ocorrido tendo em conta a quantidade de polímero que se formou. Desta forma, concluiu-se que um dos problemas poderá estar na análise do polímero, ou seja, por alguma razão o RMN não tem boa resolução para os sinais da temozolomida. Este efeito já se verificou, por exemplo, no decorrer da Tese de Mestrado de Guilherme Nogueira³⁶, em que a adenina foi usada como iniciadora da polimerização. Vão-se realizar estudos de RMN com a temperatura e fazer análises de MALDI-ToF para tentar esclarecer esta situação.

3.3.3. $\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}$ + Bromocriptina

A uma solução de $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ em metanol adicionou-se triflato de prata, em excesso (1:1.5), e agitou-se durante 30 minutos. Após a adição do triflato de prata a coloração da solução escureceu, passando de laranja para laranja acastanhado. Enquanto a mistura anterior estava em agitação, para abstrair o ião cloreto, procedeu-se à desprotonação do ligando bromocriptina pela base MeONa, em solução (≈ 5 mL de metanol). Após os 30 minutos, adicionou-se o ligando bromocriptina e levou-se a mistura a refluxo durante 11 horas. Após as 14 horas, a solução apresentava uma coloração castanha, filtrou-se a solução para separar o precipitado formado, AgCl (s), e recristalizou-se o precipitado castanho por difusão lenta de solventes em metanol/éter etílico.

A interpretação do espectro ^1H -RMN foi difícil devido à sua complexidade, foi impossível identificar o sinal correspondente ao ciclopentadienilo. No espectro de ^{31}P RMN observou-se a existência de um sinal maioritário a 24.9 ppm para além de outros 4 sinais. Além disso, por cromatografia em camada fina verificou-se o número de manchas que o produto continha, utilizando como eluente metanol e observaram-se várias manchas que não apresentavam o mesmo índice de retenção (R_f) que os reagentes, tendo-se concluído que correspondiam a impurezas e possivelmente a mancha castanha mais intensa podia corresponder ao produto. Contudo, as recristalizações sucessivas e os vários eluentes testados para uma possível purificação por cromatografia preparativa, não tiveram sucesso.

Também se optou por utilizar a base trietilamina para a desprotonação do ligando, no entanto, os resultados foram inconclusivos.

Capítulo 4

Estudos Biológicos

Capítulo 4: Estudos Biológicos

4.1. Estudos de estabilidade em solvente orgânico e meio de cultura celular

Nos estudos com células é necessário estudar a estabilidade dos complexos sintetizados no meio em que são solubilizados e no meio de cultura celular. Para além disso, há a possibilidade de ocorrer troca de ligandos, em certos compostos que contêm ligandos lábeis (como por exemplo o Cl^-), por outras moléculas presentes no meio de cultura celular. Neste caso, não se trata de instabilidade do composto, uma vez que este poderá funcionar como pró-fármaco. Este é inclusivamente o caso da cisplatina³⁷, composto em uso clínico, que apenas é ativo após hidrólise da ligação Pt-Cl , formando o composto monocatiónico *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)\text{Cl}]^+$.

Desta forma, para a determinação da estabilidade dos compostos **(1)**-**(3)** utilizou-se a técnica UV-Vis através da qual se avaliou a percentagem de variação do composto ao longo do tempo. Uma vez que os compostos **(1)**-**(3)** não são solúveis em água recorreu-se à utilização de DMSO como co-solvente e, desta forma, estudou-se também a estabilidade dos compostos **(2)** e **(3)** neste solvente por um período de 24 horas. De seguida, foi realizado o estudo em meio celular para os compostos **(1)**, **(2)** e **(3)** contendo 2-5% de DMSO. Esta foi a percentagem mínima para que não ocorresse precipitação durante o estudo UV-Vis em que foram usadas concentrações na gama 100-400 μM . No entanto, nos ensaios biológicos esta percentagem não excedeu 1%.

Os meios celulares foram selecionados tendo em conta o nível de exigência de cada linha celular. O meio celular DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) é um meio de cultura muito usado sendo constituído por vários aminoácidos, vitaminas e sais inorgânicos, com ou sem vermelho de fenol. O estudo neste meio, que é usado na cultura celular das células U87, foi realizado em 95% DMEM (+ GlutaMAX suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS) e 1% penicilina/estreptomicina) e 5% DMSO. As leituras foram efetuadas durante a primeira hora de 10 em 10 minutos, e posteriormente de 30 em 30 minutos até às 6h30 min. A última leitura foi feita no dia seguinte, 24 horas após a primeira leitura. Foram realizados também estudos nos meios de cultura celular apropriados para as linhas celulares GH3 e MMQ: F-12 K suplementado com 15% de soro de cavalo e 2.5% de soro fetal bovino (FBS). As leituras foram realizadas às 3h, 24h e 48h que correspondem aos tempos de incubação usados nos ensaios de viabilidade celular.

Como se pode verificar no **Gráfico 1**, os complexos **(2)** e **(3)** apresentam uma variação de aproximadamente 50% após 24 horas em DMSO, sendo este o seu tempo de meia-vida.

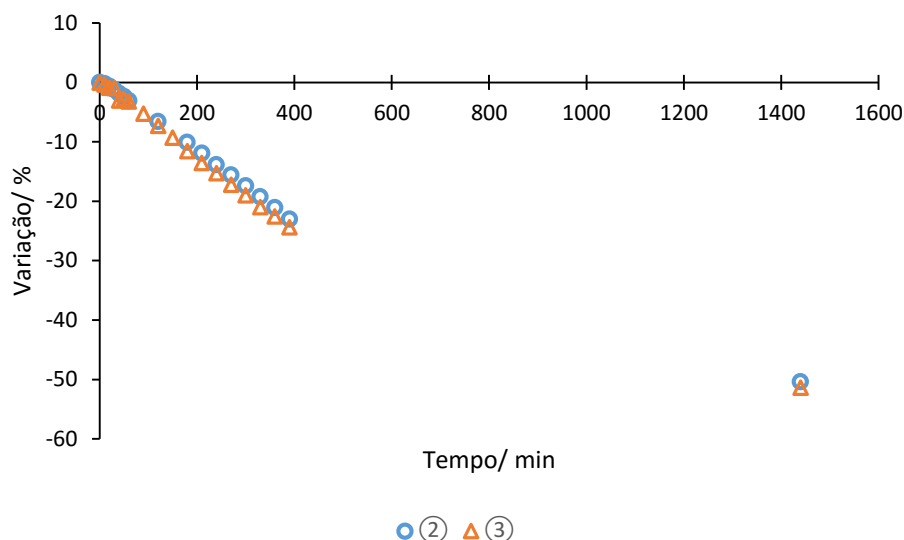


Gráfico 1 – Representação gráfica da variação da absorvância do complexo **(2)** e **(3)** em DMSO ao longo do tempo

Seguidamente, avaliou-se a estabilidade de todos os compostos em 95% DMEM e 5% DMSO, mimetizando o meio de cultura utilizado para os ensaios com a linha celular U87. Verificou-se que o complexo **(1)** apresenta a menor taxa de variação, inferior a 15%, concluindo-se que é o complexo mais estável. O complexo **(3)** é o que apresenta a maior taxa de variação ao longo do tempo, atingindo os 40% após 24 horas em solução. Por fim, o complexo **(2)** evidencia uma variação menos acentuada nas primeiras 6 h comparando com o complexo **(3)**. Contudo ao fim de 24 horas, a percentagem de variação é semelhante à do complexo **(3)**, cerca de 40%. Conclui-se portanto que nestas condições o tempo de meia-vida dos compostos é superior àquele encontrado para uma solução de DMSO. Sabendo que a percentagem de DMSO utilizada nos ensaios biológicos nunca foi superior a 1%, podemos inferir que o tempo de meia-vida dos compostos nessas condições poderá ainda ser superior.

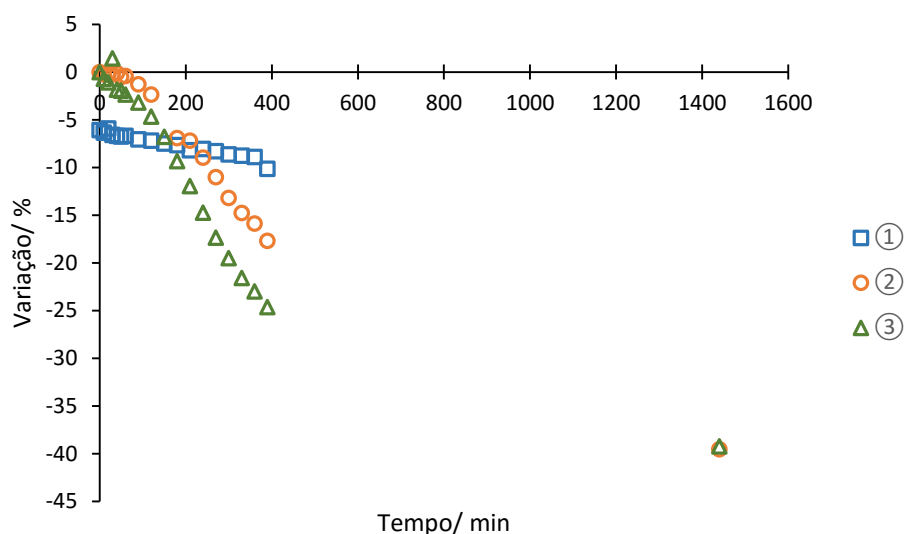


Gráfico 2 – Variação da absorvância ao longo do tempo dos complexos **(1)-(3)** em 95% DMEM/5% DMSO (v/v)

De seguida, estudou-se a estabilidade dos complexos no meio de cultura F12 K completo, tendo em conta que o meio é enriquecido com diversas substâncias que podem interferir com a ação dos compostos. Assim, os compostos foram solubilizados em 98% de meio de cultura F12 K (suplementado com 15% de soro de cavalo e 2.5% de soro fetalico) e 2% DMSO. Os resultados encontram-se representados no **Gráfico 3** que nos permite concluir que os complexos **(1)** e **(3)** apresentam a menor variação, inferior a 15%. Verificou-se que em meio de cultura celular F12 K a percentagem de variação para o complexo **(3)** foi bastante inferior do que a obtida em DMEM (**Gráfico 2**). A justificação para este comportamento pode estar associado com o facto deste meio apresentar um elevado teor de proteínas e outras substâncias que auxiliam na estabilização de macromoléculas, como é o caso deste complexo.

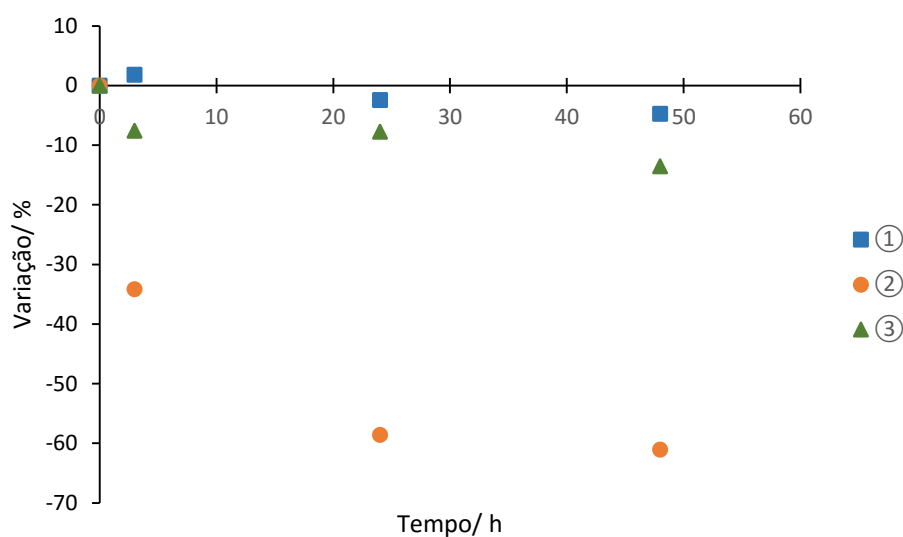


Gráfico 3 – Representação gráfica da variação da absorvância dos complexos **(1)-(3)** em 98% meio completo/ 2% DMSO (v/v) com o tempo

4.2. Estudos de viabilidade celular

A citotoxicidade dos complexos **(1)**, **(2)** e **(3)**, foi avaliada com base nos resultados de percentagem de viabilidade celular e, sempre que possível, através dos valores de IC_{50} dos compostos em três tipos de linhas celulares, duas linhas celulares não-tumorais do adenoma da hipófise de rato (GH3 e MMQ) e uma linha celular tumoral do glioma humano (U87). Foi também avaliada a atividade do complexo **TM90**, por analogia com o complexo **(2)** e para analisar as principais diferenças entre os dois complexos através da relação estrutura-atividade.

Para determinar a viabilidade celular e avaliar o potencial antitumoral destes complexos foram utilizados dois ensaios colorimétricos distintos, MTT um ensaio de referência e o WST-8,

As linhas celulares não-tumorais do adenoma da hipófise, GH3 e MMQ são provenientes de ratos da espécie *Rattus norvegicus*, que foram criteriosamente selecionadas de acordo com o objetivo pretendido, ou seja, células secretoras de hormonas diferentes. As células GH3

apresentam uma morfologia epitelial, são pouco aderentes e caracterizam-se por serem secretoras de prolactina e hormona de crescimento. As células MMQ também apresentam uma morfologia epitelial, desenvolvem-se em suspensão, ou seja, são não-aderentes e são apenas secretoras de prolactina. A linha celular tumoral do glioma humano, U87, foi escolhida uma vez que muitos dos agentes terapêuticos utilizados no tratamento dos adenomas da hipófise são também utilizados no tratamento do glioma, e assim verificar se estes compostos são ativos numa linha celular carcinogénica. As principais diferenças entre as linhas celulares escolhidas residem no seu tipo (tumoral ou não-tumoral), na forma de crescimento (monocamada ou suspensão) e, no caso das não-tumorais, no tipo de hormona que é secretada. A característica das células (aderentes ou não-aderentes) influencia a escolha do método para a determinação da viabilidade celular, uma vez que o ensaio colorimétrico mais utilizado, o MTT, é mais adequado para células aderentes. Por isso, foi conveniente utilizar outro método, o WST-8, que é adequado para todos os tipos de células, incluindo as aderentes.

O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é um composto carregado positivamente e é capaz de penetrar facilmente nas células³⁸. As células viáveis que apresentam metabolismo ativo reduzem o MTT em cristais de formazan, de cor púrpura, e estes cristais acumulam-se no interior das células, formando um precipitado insolúvel. Quando as células morrem, perdem a capacidade de converter o MTT em formazan e assim a formação de cor é um indicador do número de células viáveis. O mecanismo celular de redução envolve a transferência de eletrões da molécula NADH para a molécula MTT, de acordo com o esquema apresentado na Fig. 20. Uma vez que o formazan é insolúvel no meio celular, posteriormente é necessário um passo adicional de dissolução dos cristais, em DMSO, permitindo assim a leitura da absorvância a 570 nm, que corresponde ao comprimento de onda de absorção máxima³⁸.

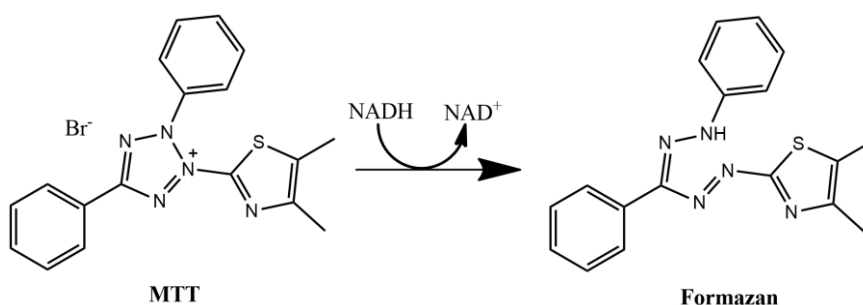


Figura 20 - Mecanismo de redução no ensaio colorimétrico MTT

O WST-8 (2-(2-metóxido-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H)tetrazólio de sódio) é um análogo do MTT não permeável. É um composto carregado negativamente e, por isso, não possui a capacidade de penetrar nas células. Um transportador de eletrões assegura o transporte dos eletrões até ao exterior da célula reduzindo o WST-8 a formazan de cor laranja que é solúvel no meio das células.²

O princípio em que se baseia a redução do WST-8 está representado na Fig. 21. Tal como o MTT, a quantidade de formazan formado é diretamente proporcional ao número de células

vivas. Este método (WST-8), requer a adição de SDS (dodecil sulfato de sódio) para cessar a reação, uma vez que o processo não é interrompido, para que não existam oscilações nos valores de absorvância obtidos devido ao tempo das leituras. A absorvância é lida a 450 nm, que corresponde ao comprimento de onda de absorção máxima³⁹.

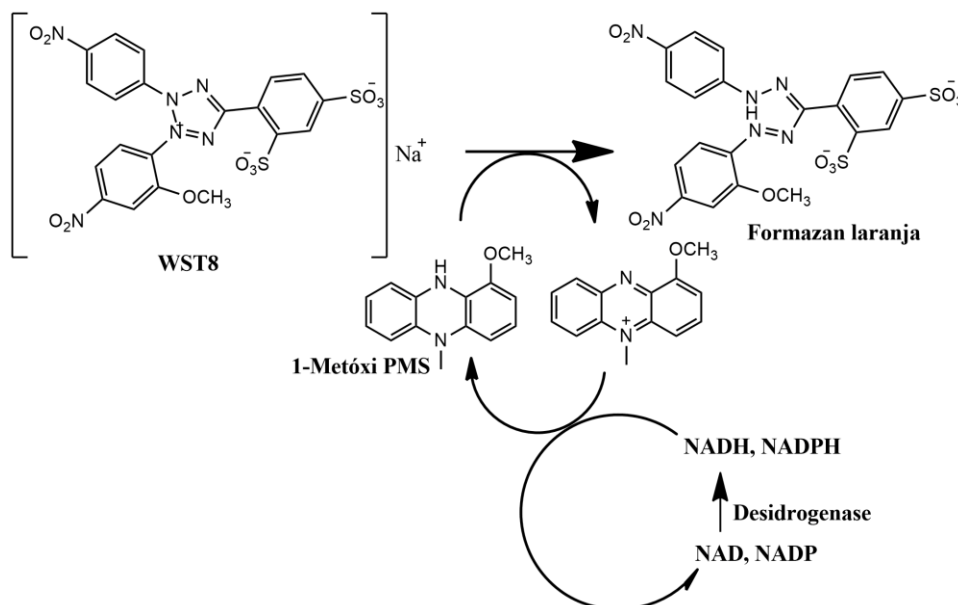


Figura 21 - Mecanismo de detecção de viabilidade celular com WST-8

O método WST-8 não tinha ainda sido otimizado no laboratório onde decorreram os ensaios. Por outro lado, seria conveniente usar um método de determinação da viabilidade celular comum a todas as linhas celulares (aderentes e não aderentes) em estudo para se conseguir fazer uma comparação direta. Desta forma, usaram-se as células U87 que são aderentes, e o complexo (1) para otimização das condições para o método WST-8, o qual foi comparado com o método MTT.

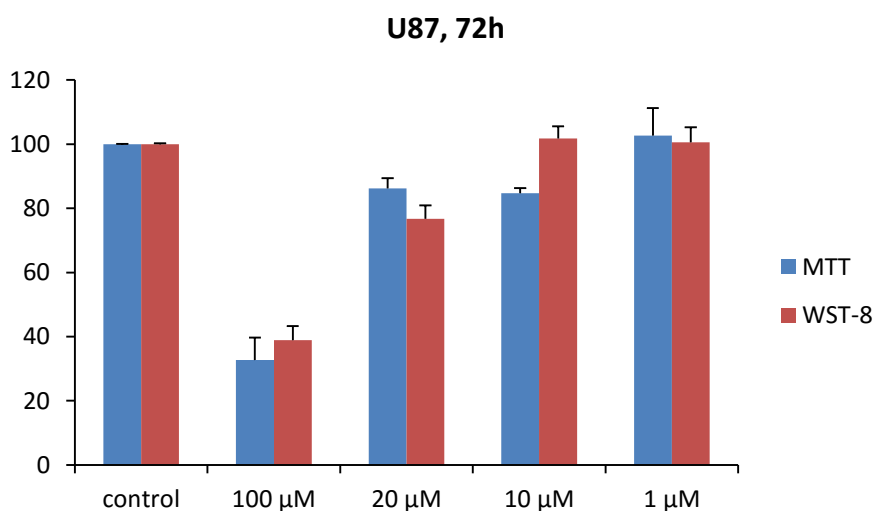


Gráfico 4 – Valores de viabilidade celular obtidos para a linha celular U87 para os métodos MTT e WST-8 após 72h de exposição

Verificou-se, de acordo com o **Gráfico 4**, que os resultados obtidos pelos dois métodos são semelhantes e apresentam a mesma sensibilidade. Perante estes resultados podemos inferir que os dois métodos se adequam ao estudo de viabilidade celular, contudo escolheu-se o método WST-8 uma vez que se aplica a todas as linhas celulares.

Após a fase de otimização do método iniciaram-se os estudos de viabilidade celular propriamente ditos. Como se pode verificar-se no **Gráfico 5**, que revela os resultados da incubação das células do glioma humano (U87) com os compostos **(1)-(3)**, à concentração de 100 μM todos os compostos induziram a morte celular em mais de metade da população celular. Para as restantes concentrações 1-20 μM verificou-se que a percentagem de viabilidade celular é superior a 80%.

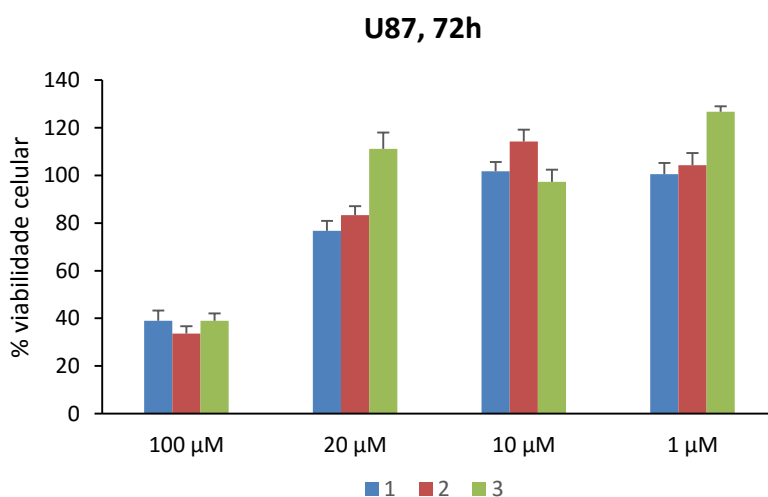


Gráfico 5 - Valores de viabilidade celular obtidos para os complexos (1) a (3) nas células do glioma humano após 72h de exposição a 37°C 5%CO₂

Foram também realizados ensaios de viabilidade celular após 24 horas de exposição na linha celular do glioma humano (U87) tendo-se verificado que os compostos **(1)-(3)** não apresentam atividade citotóxica na gama de concentrações testada, apresentando valores de viabilidade celular de aproximadamente 100%.

Concluimos que os complexos **(1)-(3)** apenas apresentam atividade citotóxica relevante na concentração mais elevada (100 μM) após 72 h de incubação com a linha do glioma humano.

Através do ensaio colorimétrico WST-8, determinou-se a percentagem de viabilidade celular na linha celular do adenoma da hipófise GH3, secretora de prolactina e hormona de crescimento, após 72 horas de exposição com os complexos **(1)**, **(2)** e **(3)**. Com o auxílio do **Gráfico 5**, verificou-se que os compostos **(1)** e **(2)** apresentaram atividade citotóxica relevante na linha celular GH3 apenas na concentração mais elevada (100 μM). Entre eles o complexo **(2)**

mostrou ser o mais citotóxico nesta linha celular. Os resultados evidenciaram a existência de aproximadamente 100% de viabilidade celular na presença de todos os compostos, na gama de concentração 1-20 μM .

Foi também realizado o estudo às 48 horas de exposição para a mesma linha celular (GH3) com os complexos **(1)**, **(2)** e **TM90**. Verificou-se que o complexo **(1)** não é citotóxico nesta linha celular uma vez que os valores de viabilidade celular foram superiores a 85% e, por isso, não serão efetuados ensaios para este composto para tempos inferiores a 48 horas. O **TM90** induziu a morte celular a 100% da população celular em todas as gamas de concentrações, concluindo-se que é o composto mais citotóxico em relação aos restantes. O complexo **(2)** apresentou uma percentagem de viabilidade celular inferior a 40% apenas para as concentrações 25 e 100 μM , para a gama de concentração 1.25-12.5 μM observou-se que o composto não apresenta atividade citotóxica relevante, onde a percentagem de viabilidade celular foi superior a 90%.

Tendo em conta, que o composto **TM90** induziu a morte celular em mais de metade da população celular, calculou-se o IC_{50} nesta linha celular, que é igual a 0.0013 μM (Anexo 2.1)

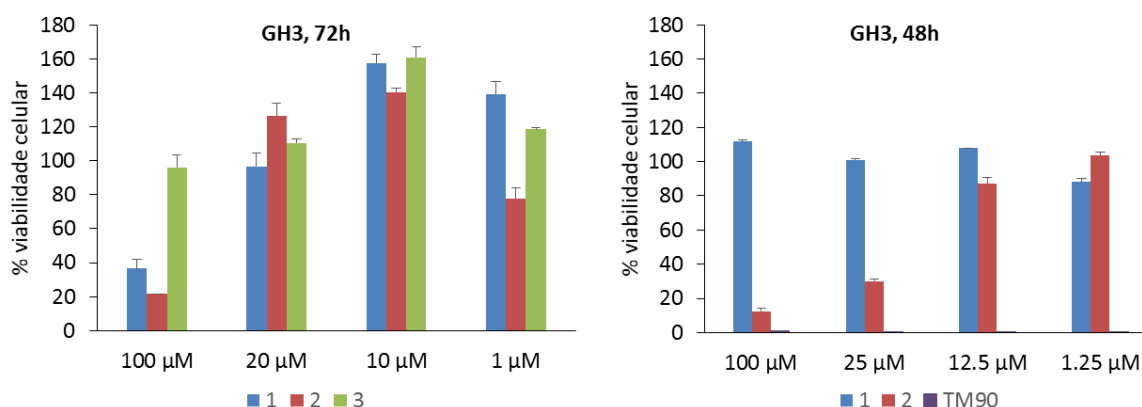


Gráfico 5 e 6 – Valores de viabilidade celular obtidos para os complexos (1) a (3) na linha celular GH3 após 72h de exposição (esquerda) e para os complexos (1), (2) e TM90 após 48h de exposição (direita) a 37°C 5%CO₂

Relativamente à linha celular do adenoma da hipófise MMQ, secretora de prolactina, os ensaios às 48 horas revelaram que o complexo **(2)** apresenta atividade citotóxica apenas para a concentração mais elevada (100 μM), sendo a percentagem de viabilidade celular inferior a 10%. Contudo para as concentrações 12.5 e 25 μM a percentagem de viabilidade celular excedeu os 85%. O complexo **(1)** não é citotóxico nestas condições experimentais, e não foi testada a sua atividade para tempos de incubação inferiores a 48 horas.

Como já foi referido, utilizou-se o composto TM90 com o intuito de comparar a sua atividade face ao seu análogo, complexo **(2)**. Pela interpretação do **Gráfico 7**, concluímos que o complexo **TM90** é muito citotóxico nesta linha celular, e induz a morte celular a toda a

população, tendo-se obtido um valor de IC₅₀ de 0.0097 μ M (Anexo 2.1). Este resultado evidencia que mesmo pequenas alterações estruturais nos complexos, neste caso composto **(2)** vs. **TM90**, onde houve apenas a introdução de um grupo ácido carboxílico no ligando fosfano, potencia atividades citotóxicas completamente diferentes. Esta diferença pode estar relacionada com o facto do **TM90** possuir uma carga global positiva, proporcionando uma interação mais forte com a membrana celular, uma vez que a membrana celular é carregada negativamente, o que facilita o processo de internalização do complexo. Por outro lado, o complexo **(2)** apresenta uma carga global neutra, levando a que a interação com a membrana celular não seja tão intensa, comparativamente ao **TM90**, e por isso os resultados para os dois análogos sejam tão discrepantes.

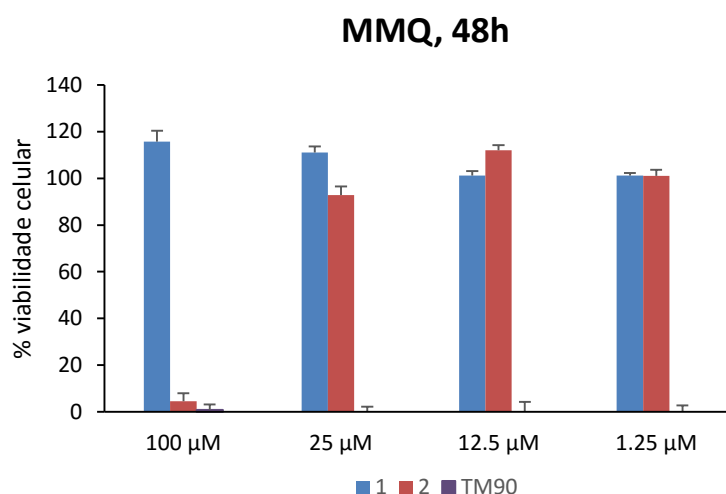


Gráfico 7 – Resultados dos ensaios de viabilidade celular na linha celular MMQ após 48h de incubação com os complexos (1), (2) e TM90 a 37°C 5%CO₂

Tendo em consideração os resultados obtidos (Gráfico 8 e tabela A1) para os complexos (2) e TM90 e tendo presente a relação estrutura/atividade avaliou-se a atividade citotóxica destes complexos na linha celular MMQ após 24 horas de exposição, fazendo um ajuste às concentrações a estudar com base nos resultados das 48 h.

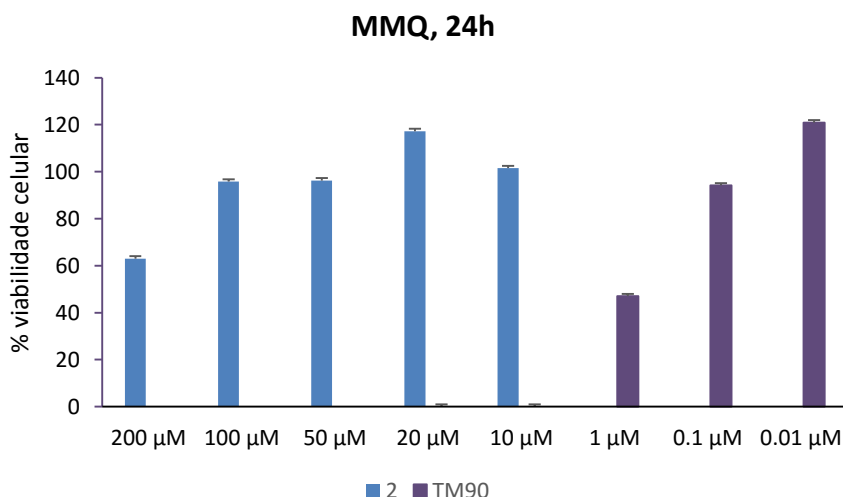


Gráfico 8 – Valores dos ensaios de viabilidade celular na linha celular MMQ para o complexo (2) e TM90 após 24h de exposição a 37°C 5%CO₂

Como podemos verificar, através do **Gráfico 8**, o complexo **(2)** não é citotóxico às 24 h para as gamas de concentração testadas uma vez que a percentagem de viabilidade celular foi de 100% (exceto para a concentração 200 μ M que foi inferior - 63%). Em relação ao complexo **TM90**, verificou-se que possui uma atividade citotóxica elevada, pois mesmo em concentrações reduzidas induziu a morte em toda a população celular (10-20 μ M). Na gama de concentração 0.01-0.1 μ M este complexo apresenta valores de aproximadamente 100% de viabilidade celular.

Os estudos de viabilidade celular realizados permitiram concluir que o composto **(1)** não é citotóxico nas linhas celulares estudadas, exceto para o ensaio com as linhas celulares GH3, secretora de prolactina e hormona do crescimento e, U87, do glioma humano, onde a percentagem de viabilidade celular foi inferior a 40% após 72 horas de exposição para a concentração mais elevada. Em relação ao complexo **(2)**, foi o complexo que apresentou maior atividade citotóxica de entre os compostos sintetizados, onde mostrou ser ativo em todas as linhas celulares após 48 e 72 horas de exposição, com atividade mais pronunciada na linha MMQ, secretora de apenas prolactina. O complexo **(3)** polimérico precisa de ser mais estudado, mas segundo resultados da literatura, normalmente apresenta um processo de internalização mais lento (por endocitose). O **TM90**, que como mencionado anteriormente foi usado neste estudo para inferir sobre a relação estrutura/atividade entre este composto e o seu análogo (complexo **(2)**), mostrou ser muito citotóxico nas linhas celulares do adenoma da hipófise, como tal não é apropriado para a finalidade pretendida. Contudo, é de realçar que os compostos propostos e sintetizados neste trabalho têm em vista a futura aplicação em terapia fotodinâmica (uma vez que têm uma absorção intensa na zona do visível) ou por radiação de fotões. Neste âmbito, um dos pontos-chave seria a obtenção de compostos que não fossem citotóxicos na ausência destas duas fontes de energia, o que foi conseguido com sucesso. Futuramente, um dos caminhos a seguir será estudar qual a percentagem de ruténio que é internalizada nas células e também o mecanismo de ação dos compostos nas células quando irradiados com uma fonte de luz visível e/ou uma fonte de fotões.

Capítulo 5

Materiais e Métodos

Capítulo 5: Materiais e Métodos

5.1. Considerações Gerais

As sínteses dos complexos organometálicos descritas neste capítulo foram realizadas utilizando técnicas de *Schlenk* em atmosfera inerte de azoto de acordo com as técnicas de manipulação habituais neste tipo de trabalho⁴⁰. As polimerizações descritas foram realizadas em atmosfera inerte de azoto assim como toda manipulação de reagentes efetuada.

5.2. Solventes e Reagentes

A maioria dos solventes utilizados nas sínteses organometálicas foram adquiridos à Sigma-Aldrich e foram utilizados sem qualquer tipo de purificação, há exceção das funcionalizações. A purificação dos compostos sintetizados foi realizada com solventes previamente secos e destilados em atmosfera inerte de azoto, de acordo com os métodos descritos na literatura e, que são apresentados na tabela seguinte:

Tabela 7 - Procedimento de secagem dos diversos solventes utilizados

Solvente	Ponto de ebulição/ °C	Pré-secagem	Refluxo-Destilação
Diclorometano	40.0	CaCl ₂	CaH ₂
n-Hexano	68.7	CaCl ₂	Fio de Sódio
Tetrahidrofurano	66.0	Fio de Sódio	Fio de Sódio/ Benzofenona
Tolueno	110.6	-	Sódio/ Benzofenona

5.3. Técnicas usadas

5.3.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H, ¹³C, ³¹P e bidimensionais foram efetuados num espectrómetro Bruker Avance de 400 MHz, à temperatura ambiente. Os solventes deuterados: acetona-d₆ (99.9%), dimetilsulfóxido-d₆ (99.9%) e metanol-d₄ (99.8%), foram usados sem purificação, tal como adquirido à Cambridge Isotope Laboratories (CIL) e à VWR. Os desvios químicos são apresentados em partes por milhão (ppm) utilizando como padrão interno o TMS (0.00 ppm) a 0.03%.

5.3.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelhos dos complexos sintetizados foram adquiridos num espectrómetro Shimadzu IRAffinity-1 FTIR. Prepararam-se pastilhas de KBR (ao ar) não tendo sido realizada qualquer calibração adicional.

5.3.3. Espectroscopia de Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

Os espectros eletrónicos dos complexos organometálicos foram realizados ao ar e à temperatura ambiente, em células de quartzo com 1 cm de largura, utilizando como solvente diclorometano, metanol e dimetilsulfóxido, sem desarejamento prévio da solução, num espectrómetro Jasco V-660 de feixe duplo.

5.3.4. Análise Elementar

As determinações das percentagens de C, H, N, e S foram realizadas no Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico, num equipamento Fisons Instruments, modelo EA1108.

5.3.5. Estudos Biológicos

5.3.5.1. Estudos de estabilidade em meio celular

Os estudos de estabilidade foram realizados no Laboratório de Química Organometálica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Os ensaios de estabilidade foram realizados para os complexos organometálicos sintetizados em meio celular DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), sendo primeiramente dissolvidos em DMSO, não excedendo 5% (v/v) da solução. Foram também realizados estudos com os meios celulares usados nos ensaios de viabilidade celular, em que a solução preparada para os estudos é constituída por 98% (v/v) de meio completo e 2% (v/v) de DMSO.

5.3.5.2. Estudos de viabilidade celular em linhas celulares não-tumorais e tumoral

Os estudos biológicos foram realizados no Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares (C²TN) do Instituto Superior Técnico – Pólo de Loures da Universidade de Lisboa, sob orientação da Dr.^a Fernanda Marques.

A linha celular tumoral humana do glioma, U87, e as linhas celulares não-tumorais pituitárias, GH3 e MMQ, todas provenientes da ATCC, foram cultivadas em frascos de cultura T25 e colocadas numa estufa (SANYO CO₂ Incubator) a 37°C e 5% CO₂. O meio de cultura DMEM Glutamax utilizado nos estudos celulares para a linha celular U87, continha 10% FBS e 1% penicilina/estreptomicina. No caso das linhas celulares não-tumorais, o meio de cultura utilizado F-12 Nut Mix, foi completo com 15% de soro de cavalo e 2.5% de FBS.

As células U87 e GH3 cresceram em monocamada e quando atingiram a confluência foram colhidas por digestão com tripsina-EDTA. As células MMQ, por serem células não-aderentes foram colhidas por centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5804R, 950 rpm, 4 min).

A citotoxicidade dos complexos organometálicos nas diferentes linhas celulares foi avaliada através de dois ensaios colorimétricos distintos, baseado no corante de tetrazólio MTT e no corante de tetrazólio solúvel em água WST8. A diferença entre estes dois métodos reside na formação de cristais de formazan insolúveis em água no caso do MTT, enquanto que no ensaio colorimétrico baseado no corante WST8 o formazan formado é solúvel em água. Para os estudos de citotoxicidade foram cultivadas as células U87 ($15\text{-}20 \times 10^3$ em 200 μL de meio por poço) e as células GH3 e MMQ ($15\text{-}25 \times 10^3$ em 100 μL de meio por poço) em placas de 96 poços e incubadas a 37°C 5% CO₂ durante 24 horas para aderirem às placas. Após 24 horas, seguiu-se a adição de uma série de diluições dos complexos (a gama de concentrações está compreendida entre 0.01-200 μM) em 100 ou 200 μL de meio. Todos os complexos organometálicos de **(1)**, **(2)**, **(3)** e **TM90** foram dissolvidos primordialmente em DMSO (10-20 mM – concentração stock), seguindo-se a adição de meio para perfazer as concentrações finais desejadas.

Após 24h, 48h ou 72h de incubação (Heraeus Cell 150, Germany) com os compostos, no ensaio colorimétrico baseado no corante de tetrazólio MTT o sobrenadante foi removido por aspiração e a solução de MTT (200 μL , 0.5 mg/ mL em PBS) foi adicionada a cada poço. Após 2h a 37°C 5% CO₂, a solução foi removida por aspiração e os cristais de formazan de cor púrpura, formados no interior das células foram dissolvidos em DMSO (200 μL). Os resultados de absorvância das soluções foram medidos a 570 nm utilizando um espectrofotómetro de placas PowerWave XS Bio-Tek Instruments sendo posteriormente convertida em percentagem de viabilidade celular. No caso do ensaio colorimétrico baseado no corante de tetrazólio solúvel em água WST8 o sobrenadante não foi removido, e a solução de WST8 (25 μL na proporção 1:1.5 de WST-8 e meio completo, respetivamente) foi adicionada a cada poço. Após 2h de incubação a 37°C 5% CO₂, adicionou-se uma solução de SDS 1% (10 μL) que teve como função cessar a reação. Por fim, os resultados de absorvância das soluções foram medidos a 450 nm utilizando um espectrómetro de placas sendo posteriormente convertida em percentagem de viabilidade celular.

Os resultados de viabilidade celular correspondem à média e desvio padrão obtidos, cada uma compreendendo quatro ou seis replicados para cada concentração dos complexos de Ruténio e controlo.

Os efeitos citotóxicos dos compostos foram quantificados, através do cálculo dos valores de IC₅₀ que consiste na concentração que induz a morte celular em 50% das células, baseados em análise de regressão não-linear da dose resposta (percentagem de viabilidade celular) dos dados obtidos.

5.4. Procedimentos

5.4.1. Síntese e caracterização do polímero

5.4.1.1. Purificação dos reagentes

As polimerizações foram realizadas com o monómero D,L-Lactídeo, que foi recristalizado três vezes em tolueno seco sob atmosfera inerte de azoto e deixado a secar a vácuo durante uma noite. Posteriormente, foi conservado no frio sob atmosfera de azoto para posterior utilização. A 4-dimetilaminopiridina, DMAP, foi seca durante uma noite a vácuo e conservado à temperatura ambiente sob atmosfera de azoto. O álcool benzílico foi seco e destilado em atmosfera de azoto de acordo com os métodos publicados na literatura e que está presente na tabela 8:

Tabela 8 – Processo de secagem dos diferentes solventes utilizados

Solvente	Ponto de Ebulição/ °C	Pré-secagem	Refluxo-Destilação
Tolueno	110.6	-	Sódio/ Benzofenona
Álcool Benzílico	205	CaH ₂	Fio de Sódio

5.4.1.2. Polilactídeo

Num *Schlenk* junta-se 1 g (7 mmol) de D,L-lactídeo, 56,5 mg (0.46 mmol) de DMAP e adicionam-se 48 µL (0.46 mmol) de álcool benzílico. A mistura é colocada num banho de óleo a 135°C durante 5 minutos. Passados 5 minutos, retira-se o *Schlenk* do banho de óleo e adicionam-se algumas gotas de uma mistura de água e metanol (50/50) (% v/v) para fazer o *quench* da reação. O polímero formado é dissolvido em diclorometano, e seguidamente transfere-se o conteúdo do *Schlenk* para um balão de fundo redondo contendo a mistura de água e metanol e evapora-se parcialmente a solução, no evaporador rotativo, para auxiliar na precipitação total do polímero. Por fim, lava-se o polímero com éter etílico para remover vestígios de DMAP e D,L-lactídeo que eventualmente não reagiu e seca-se a vácuo o produto durante uma noite.

¹H-RMN: [(CD₃)₂CO, Me₄Si, δ/ ppm (multiplicidade, integração, atribuição)]: 7.40 [m, 5, H₁+H₂+H₃], 5.22 [m, 23.4, H₅+H₄], 4.33 [m, 1.00, H_{5'}], 1.56 [m, 67.3, H₆], 1.41 [m, 3.23, H_{6'}]

5.4.2. Síntese dos compostos organometálicos

Complexo 1: Síntese do $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_6)_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH})_2)\text{Cl}]$

Foi colocada uma porção de peneiros moleculares em pó num *Schlenk*, ao qual foi adicionado uma solução de tricloreto de rutênio (III) hidratado (200 mg, 0.98 mmol) em metanol (≈ 20 mL), ciclopentadienilo recém-destilado (1.22 mL) e ácido 4-(difenilfosfino)benzóico (754 mg, 2.46 mmol). A mistura foi refluxada durante 14 horas, à temperatura de ebulição do metanol (64.7°C). Após o refluxo, deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente, filtrou-se a solução e levou-se à secura. Os peneiros moleculares foram sucessivamente lavados com metanol até ficarem sem cor e a solução amarela resultante foi evaporada. O produto obtido foi lavado três vezes com diclorometano anidro e éter etílico, posteriormente foi seco a vácuo durante uma noite. Obteve-se 394 mg de produto ($\eta = 49.2\%$), sob a forma de pó amarelo.

Análise Elementar, experimental (calculado) para $\text{C}_{43}\text{ClO}_4\text{P}_2\text{Ru}\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$: C 59.4 (58.7), H 4.10 (4.15)

^1H -RMN: $[(\text{CD}_3)_2\text{SO}, \text{Me}_4\text{Si}, \delta/\text{ppm}$ (multiplicidade, integração, atribuição)]: 13.0 (s, 1.65, H_7), 7.68 (d, 4.85, H_6) 7.28 (m, 27.4, $\text{H}_2+\text{H}_3+\text{H}_4+\text{H}_5$), 4.11 (s, 5.00, H_1)

^{13}C -RMN: $[(\text{CD}_3)_2\text{SO}, \delta/\text{ppm}]$: 166.8 (C_9), 143.2 (C_5), 133.3 (C_6), 130.8, 129.2, 128.1, 127.7 (C_7), 81.3 (C_1)

^{31}P -RMN: $[(\text{CD}_3)_2\text{SO}, \delta/\text{ppm}]$: 39.4

UV-Vis [DMSO, $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)] : 348 (3670);

IV [KBr, cm^{-1}]: 3441 (estiramento O-H), 3053 (estiramento C-H aromáticos), 1699 (estiramento C=O), 1598 (estiramento C=C), 1433 (vibração O-H), 1298 (estiramento C-O), 835 (vibração C-H)

Complexo 2: Síntese do $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_6)_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}))_2(\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO})][\text{CF}_3\text{SO}_3]$

Este composto foi preparado a partir do complexo 1 (200 mg, 0.24 mmol), dissolveu-se o mesmo em metanol (≈ 20 mL) e adicionou-se uma porção de peneiros moleculares em pó. Seguidamente, juntou-se triflato de prata em excesso (94.8 mg, 0.36 mmol) e deixou-se sob agitação durante 1 hora à temperatura ambiente, tendo o cuidado de proteger a solução da luz. Passada 1 hora, seguiu-se a adição de 2-benzoílopiridina (49.6 mg, 5.4 mmol) e a mistura foi levada a refluxo durante 5 horas. Seguidamente, filtrou-se a solução, levou-se à secura e purificou-se o pó violeta através de cromatografia em camada fina. Escolheu-se uma placa de sílica, representando a fase estacionária, e o eluente escolhido foi uma mistura de diclorometano e metanol, na proporção 2:0.01. Dissolveu-se o produto violeta em metanol, aplicou-se na placa de sílica, tendo o cuidado de secar a zona de aplicação entre cada aplicação

e colocou-se a placa na câmara cromatográfica. Após eluição, raspou-se a região correspondente ao produto desejado de cor violeta e extraiu-se o composto da sílica através da dissolução do mesmo em metanol, filtrou-se a solução e evaporou-se o solvente. Por fim, recristalizou-se o produto em diclorometano/hexano anidro, obtendo-se um pó de cor violeta, com um rendimento de 34% (68 mg).

Tendo em conta o rendimento desta reação, tentou-se otimizar a síntese deste complexo organometálico, de modo a aumentar significativamente o rendimento da mesma. O complexo foi preparado a partir do complexo 1 (206 mg, 0.25 mmol), dissolveu-se o mesmo em metanol (≈ 20 mL) e adicionou-se uma porção de peneiros moleculares pó. Seguidamente, juntou-se triflato de prata em excesso (139 mg, 0.54 mmol) e deixou-se a agitar durante 1 hora à temperatura ambiente, tendo o cuidado de proteger a solução da luz. Passada 1 hora, seguiu-se a adição de 2-benzoílopiridina (51.3 mg, 0.27 mmol) e a mistura foi levada a refluxo durante 9 horas. Seguidamente, filtrou-se a solução, evaporou-se o solvente e lavou-se três vezes com hexano anidro. Por fim, recristalizou-se o produto em diclorometano/hexano anidro, obtendo-se um produto de cor violeta, com um rendimento de 72% (154 mg).

Análise Elementar, experimental (calculado) $C_{39}H_{35}F_3NO_6PRuS \cdot 2CH_2Cl_2$: C 48.6 (49.2), H 3.40 (3.91), N 1.20 (1.39), S 4.00 (3.19)

1H -RMN: [CD_3OD , Me_4Si , δ / ppm (multiplicidade, integração, atribuição)]: 9.67 (d, 0.90, H_8), 8.18 (d, 0.90, H_{11}), 7.91 (m, 1.09, H_{10}), 7.72 (d, 1.99, H_{12}), 7.62 (t, 2.12, H_{14}), 7.51 (m, 3.62, H_9), 7.42 (d, 3.93, H_5+H_6), 7.30 (m, 8.62, $H_2+H_3+H_4$), 7.01 (t, 1.96, H_{13}), 4.76 (s, 5.00, H_1)

^{13}C -RMN [CD_3DO , δ / ppm]: 200.4 (C_9), 157.9 (C_{10}), 151.6 (C_{11}), 137.3 (C_{12}), 135.4, 134.8, 130.0 (C_{14}), 129.9, 129.6, 123.3, 78.3 (C_1)

^{31}P -RMN: [CD_3OD , δ / ppm]: 48.2

UV-Vis [DMSO, λ_{max} / nm (ϵ / $M^{-1} cm^{-1}$)]: 529 (6377); 285 (16285)

IV [KBr , cm^{-1}]: 3431 (estiramento O-H), 3057 (estiramento C-H), 1595 (estiramento C=C), 1338 (estiramento C-N aromático), 1261 (estiramento CF_3SO_3), 1029 (estiramento C-O), 842 (vibração C-H)

Complexo 3: Síntese do $[Ru^{II}(\eta^5-C_5H_5)(P(C_6H_5)_2(C_6H_4COOH))((C_{12}H_9NO)-(poli-LA-OC_7H_7))][CF_3SO_3]$

Este complexo organometálico foi preparado a partir do complexo 2. Dissolveu-se o polímero polilactídeo (137 mg, 0.69 mmol) em 50 mL de THF anidro, adicionaram-se 19 μL de Et_3N (0.13 mmol) e deixou-se a agitar à temperatura ambiente durante 1 hora. Seguidamente, adicionou-se o complexo 2 (86 mg, 0.10 mmol) e a reação prosseguiu à temperatura de refluxo

do THF até remoção completa da água formada ao longo da reação usando uma montagem *Dean-Stark*. O produto foi recristalizado em diclorometano/hexano anidros, obteve-se um produto violeta, com 56% de rendimento (71 mg).

¹H-RMN: [(CD₃)₂CO, Me₄Si, δ/ ppm (multiplicidade, integração, atribuição)]: 9.89 (d, 0.86, H₁₃), 8.30 (d, 0.91, H₁₆), 8.05 (t, 0.93, H₁₅), 7.95 (d, 3.06, H₁₉), 7.68 (d, 2.66, H₁₄), 7.56 (t, 3.97, H₅+H₆), 7.40 (m, 12.8, H₂+H₃+H₄+H₁₀+H₁₁+H₁₂), 7.30 (d, 2.64, H₁₈), 5.20 (m, 72.6, H₇), 4.88 (s, 5.00, H₁), 4.32 (m, 2.56, H_{7'}), 1.55 (m, 207.2, H₈), 1.39 (m, 7.73, H_{8'})

¹³C-RMN: [(CD₃)₂CO, δ/ ppm]: 170.2 (C₁₅), 129.8, 129.4, 129.0 (C₁₂), 78.0 (C₁), 69.6 (C₁₃), 32.33, 23.32, 17.1 (C₁₄), 14.36

³¹P-RMN: [(CD₃)₂CO, δ/ ppm]: 48.4

UV-Vis [DMSO, λ_{max}/ nm (ε / M⁻¹ cm⁻¹)] : 528 (5732) ; 294 (14511)

IV [KBr, cm⁻¹]: 1759 (estiramento C=O), 1598 (estiramento C=C), 1263 (estiramento CF₃SO₃), 1095 (estiramento C-O), 808 (vibração C-H)

5.4.3. Síntese não concluídas/ inconclusivas

Síntese do [Ru^{II}(η⁵-C₅H₅)(P(C₆H₆)₂(C₆H₄COOH)₂)(C₁₆H₁₁NO)](CF₃SO₃)

A uma solução de [Ru^{II}(η⁵-C₅H₅)(P(C₆H₆)₂(C₆H₄COOH)₂)Cl] (1) em metanol (V≈ 20 mL) adicionou-se triflato de prata (73 mg, 0.28 mmol) e deixou-se agitar durante 1 hora, protegendo a mistura da luz com papel de alumínio, seguiu-se a adição de 1-fenilisoquinolinilacetona (27 mg, 0.11 mmol). A mistura foi levada a refluxo durante 4 horas. Ao fim desse tempo deixou-se arrefecer à temperatura ambiente, filtrou-se a solução para separar o precipitado formado durante a reação, cloreto de prata (AgCl), evaporou-se o solvente e lavou-se três vezes o precipitado com hexano anidro. Por fim, recristalizou-se por difusão lenta de solventes com diclorometano/hexano dando origem a um precipitado roxo.

Análise Elementar, experimental (calculado) para C₄₃H₃₇F₃NO₆PRuS·(AgCl)(MeOH): C 49.8 (49.8), H 3.30 (3.90), N 1.40 (1.32), S 5.00 (3.02)

¹H-RMN: [(CD₃)₂CO, Me₄Si, δ/ ppm (multiplicidade, integração, atribuição)]: 9.81 (d, 1.09, H₈), 8.14 (d, 1.63, H₁₄), 8.08 (d, 1.14, H₉), 7.76 (t, 4.22, H₅+H₆), 7.59 (m, 3.49, H₁₀+H₁₁+H₁₂+H₁₃), 7.46 (m, 11.46, H₂+H₃+H₄+H₁₆), 7.26 (t, 2.14, H₁₅), 5.09 (s, 5.00, H₁)

³¹P-RMN: [(CD₃)₂SO, δ/ ppm]: 49.0

IV [KBr, cm⁻¹]: 3441 (estiramento O-H), 1718 (estiramento C=O), 1382 (estiramento C-N), 1255 (estiramento CF₃SO₃), 1029 (estiramento C-O), 754 (vibração C-H)

PLA + Temozolomida

Num schlenk junta-se 1 g (7 mmol) de D,L-Lactídeo, 56 mg (0.46 mmol) de DMAP e adiciona-se 89 mg (0.46 mmol) de temozolomida, previamente seca a vácuo. A mistura é colocada num banho de óleo a 135°C durante 15 minutos. Após 15 minutos, retira-se o schlenk e adiciona-se algumas gotas de uma mistura de água e metanol (50/50) (% v/v) para fazer o quench da reação. O polímero é dissolvido em diclorometano e transfere-se o mesmo para um balão de fundo redondo contendo a mistura referida anteriormente. Coloca-se o balão no evaporador rotativo onde se evapora parcialmente a solução, decanta-se a solução restante e lava-se o polímero com éter etílico. Seca-se a vácuo o produto durante uma noite.

O espectro ^1H -RMN evidenciou que a polimerização não foi completa e mesmo com a alteração de alguns parâmetros reacionais não foi possível efetuar a funcionalização do ligando com PLA. Foram alterados alguns parâmetros da reação, como o tempo de polimerização (30 min, 24 horas), o monómero utilizado (L,L-Lactídeo) e o catalisador (utilizou-se o dobro da quantidade de temozolomida, desempenhando o papel de catalisador e iniciador, simultaneamente).

$\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}$ + Bromocriptina

A uma solução de $[\text{RuCp}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ em metanol (≈ 20 mL), que apresenta uma coloração laranja, adiciona-se triflato de prata em excesso (80 mg, 0.3 mmol) e deixa-se a agitar durante 30 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente, adiciona-se o ligando bromocriptina previamente desprotonado. A desprotonação é feita por intermédio da base metóxido de sódio, em solução (≈ 5 mL de metanol). Após a adição da solução de bromocriptina, a cor da solução alterou-se de laranja para castanho e a mistura é levada a refluxo durante 11 horas. Posteriormente, filtra-se a solução e a mesma é levada à secura. O precipitado castanho obtido é recristalizado em metanol/éter etílico. O espectro de ^1H -RMN obtido apresenta uma grande complexidade sendo impossível a identificação do sinal relativo ao ciclopentadienilo, além das diversas impurezas presentes no espectro.

Capítulo 6

Conclusões e Perspetivas futuras

Capítulo 6: Conclusões e Perspetivas Futuras

Os adenomas pituitários ou hipofisários apresentam uma grande diversidade estrutural e hormonal, o que dificulta a sua deteção a tempo, pois na maioria dos casos a sua existência só é detetada na autópsia. Foi neste contexto que este trabalho foi desenvolvido e, para esse fim, foram sintetizados e caracterizados três novos complexos de ruténio derivados do fragmento “Ru-Cp”.

Os complexos organometálicos foram caracterizados através de técnicas espectroscópicas de RMN, IV e UV-vis e adicionalmente foram feitos estudos por análise elementar para os complexos **(1)** e **(2)**, que permitiu confirmar a síntese bem-sucedida dos compostos pretendidos. Após a sua caracterização foram realizados estudos biológicos, mais concretamente, estudos de estabilidade em solvente orgânico e meio de cultura celular e estudos de viabilidade celular.

Os estudos de estabilidade em solvente orgânico permitiram-nos concluir que os compostos sintetizados apresentam variações significativas ao longo do tempo, em DMSO, onde os complexos **(2)** e **(3)** apresentaram um comportamento semelhante e um tempo de meia-vida de 24 horas. O estudo realizado em meio de cultura celular, 95% DMEM/5 % DMSO, mostrou que o complexo **(1)** é o mais estável, uma vez que apresentou a menor taxa de variação até às 24 horas (inferior a 15%). Os complexos **(2)** e **(3)** apresentaram um comportamento semelhante e a maior percentagem de variação, cerca de 40%. Por fim, estudou-se a estabilidade dos complexos em 98% de meio completo/2% DMSO %(v/v), meio de cultura celular utilizado para as linhas celulares não-tumorais do adenoma da hipófise, onde se observou que o complexo **(1)** apresentou a menor percentagem de variação (inferior a 10%), assim como no estudo anterior. A maior diferença foi verificada para o complexo **(3)** em relação aos estudos mencionados anteriormente, uma vez que apresentou uma taxa de variação inferior a 20% no segundo meio testado. Esta diferença pode estar relacionada com o fato do meio utilizado neste estudo, apresentar um teor mais elevado de proteínas e outras substâncias que poderão auxiliar na estabilização da macromolécula. O complexo **(2)** mostrou ser o composto menos estável, com uma percentagem de variação de, aproximadamente 60% às 24 h.

Os estudos de viabilidade celular permitiram concluir que os complexos sintetizados não apresentam atividade citotóxica nas linhas celulares não-tumorais do adenoma da hipófise e na linha celular do glioma humano, com exceção para a concentração de 100 μ M onde a percentagem de viabilidade celular na maioria dos casos foi inferior a 50%, o que está de acordo com a aplicação final pretendida para estes compostos, terapia fotodinâmica ou a irradiação por fotões.

No futuro, propõem-se a introdução dos ligandos bromocriptina e temozolomida que apresentam atividade conhecida em tumores desta natureza, permitindo assim aumentar o

espectro de ação dos compostos, em relação aos medicamentos em uso atualmente e, tirar partido das características vantajosas de todos os constituintes do composto. É ainda indispensável fazer uma otimização das sínteses, prevenindo assim todas as dificuldades sentidas na sua reprodutibilidade.

Também é importante estudar o mecanismo de ação destes complexos quando irradiados com uma fonte de luz visível e/ou uma fonte de fótons, assim como a percentagem de ruténio que é internalizada nas células.

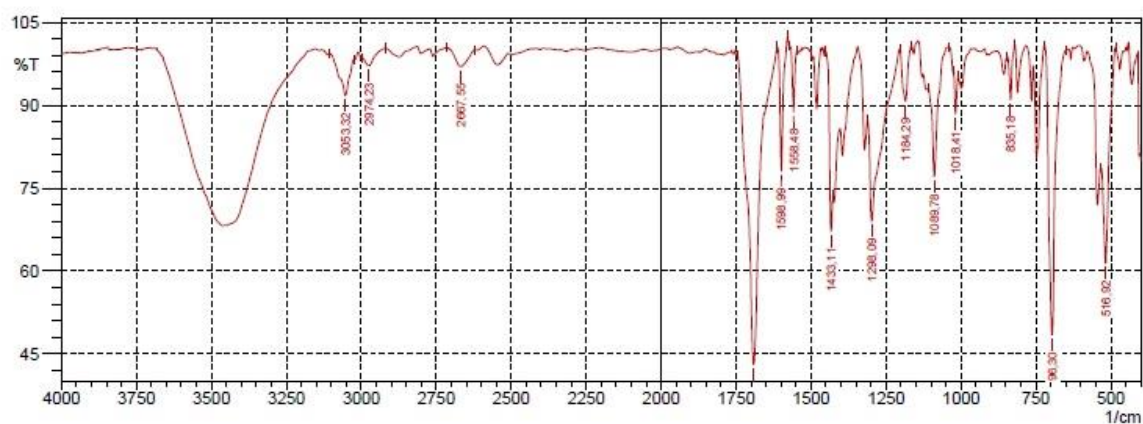
Bibliografia

1. News Medical - Adenomas. [http://www.news-medical.net/health/What-is-an-Adenoma-\(Portuguese\).aspx](http://www.news-medical.net/health/What-is-an-Adenoma-(Portuguese).aspx). Accessed May 22, 2016.
2. Drouin J. *Pituitary Development*. Third Edit. Elsevier Inc.; 2011. doi:10.1016/B978-0-12-380926-1.10001-X.
3. American Cancer Society. <http://www.cancer.org/cancer/pituitarytumors/detailedguide/pituitary-tumors-what-is-pituitary-tumor>. Accessed May 22, 2016.
4. Rua da Constituição. <https://ruadaconstituicao.wordpress.com/2014/09/11/a-hipofise/>. Accessed May 7, 2016.
5. Glândula Pituitária. <http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/hipofise.htm>. Accessed May 10, 2016.
6. Instituto Oncoguia. <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sobre-o-cancer/3978/564/>. Accessed May 22, 2016.
7. Asa SL, Ph D, Couldwell WT, et al. The Prevalence of Pituitary Adenomas A Systematic Review. 2004;(June). doi:10.1002/cncr.20412.
8. Tagliati F, Gentilin E, Buratto M, Mol?? D, Degli Uberti EC, Zatelli MC. Magmas, a gene newly identified as overexpressed in human and mouse ACTH-secreting pituitary adenomas, protects pituitary cells from apoptotic stimuli. *Endocrinology*. 2010;151(10):4635-4642. doi:10.1210/en.2010-0441.
9. Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumors. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:97-126. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092259.
10. Asa SL. What Does the Pathologist Need to Know ? :1231-1240.
11. Beckers A. Higher prevalence of clinically relevant pituitary adenomas confirmed. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(3):290-291. doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03726.x.
12. Karavitaki N. Prevalence and incidence of pituitary adenomas. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2012;73(2):79-80. doi:10.1016/j.ando.2012.03.039.
13. Neurocirurgia. <http://www.neurocirurgia.com/content/cirurgia-hipofise>. Accessed May 20, 2016.
14. World Health Organization. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Accessed May 5, 2016.
15. Miller JB. Photodynamic Therapy: The Sensitization of Cancer Cells to Light. *J Chem Educ*. 1999;76(5):592. doi:10.1021/ed076p592.
16. Fallis A. *The Biology of Cancer*. Vol 53.; 2013. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
17. Wachter E, Heidary DK, Howerton BS, Parkin S, Glazer EC. Light-activated ruthenium complexes photobind DNA and are cytotoxic in the photodynamic therapy window. *Chem Commun*. 2012;48(77):9649. doi:10.1039/c2cc33359g.
18. Article C. Dalton Transactions. 2012;41(43). doi:10.1039/c2dt31601c.

19. Dai C, Zhang B, Liu X, et al. temozolomide through cathepsin B-dependent and. 2013;1993:1982-1993. doi:10.1002/ijc.28199.
20. van Rijt SH, Sadler PJ. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discov Today*. 2009;14(23-24):1089-1097. doi:10.1016/j.drudis.2009.09.003.
21. Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans*. 2010;39(35):8113-8127. doi:10.1039/c0dt00292e.
22. Carboplatina, Oxaliplatina e Nedaplatina. http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/2849/1594. Accessed May 7, 2016.
23. Antonarakis ES, Emadi A. Ruthenium-based chemotherapeutics: Are they ready for prime time? *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;66(1):1-9. doi:10.1007/s00280-010-1293-1.
24. Tomaz AI, Jakusch T, Morais TS, et al. $[Ru(\eta^5-C_5H_5)(bipy)(PPh_3)]^+$, a promising large spectrum antitumor agent: cytotoxic activity and interaction with human serum albumin. *J Inorg Biochem*. 2012;117:261-269. doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.06.016.
25. Moreno V, Font-Bardia M, Calvet T, et al. DNA interaction and cytotoxicity studies of new ruthenium(II) cyclopentadienyl derivative complexes containing heteroaromatic ligands. *J Inorg Biochem*. 2011;105(2):241-249. doi:10.1016/j.jinorgbio.2010.10.009.
26. Côrte-Real L, Matos AP, Alho I, et al. Cellular uptake mechanisms of an antitumor ruthenium compound: the endosomal/lysosomal system as a target for anticancer metal-based drugs. *Microsc Microanal*. 2013;19(5):1122-1130. doi:10.1017/S143192761300175X.
27. Morais TS, Silva TJL, Marques F, et al. Synthesis of organometallic ruthenium(II) complexes with strong activity against several human cancer cell lines. *J Inorg Biochem*. 2012;114:65-74. doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.04.014.
28. Article R, Valente A, Zinck P. 4 . Polymer-metal complexes (PMC) for cancer therapy. 2012;661(2).
29. Valente A, Garcia MH, Marques F, Miao Y, Rousseau C, Zinck P. First polymer "ruthenium-cyclopentadienyl" complex as potential anticancer agent. *J Inorg Biochem*. 2013;127:79-81. doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.07.002.
30. Albertsson A, Varma IK. Recent Developments in Ring Opening Polymerization of Lactones for Biomedical Applications. 2003:1466-1486.
31. Windsor MIB and NJ. Cyclopentadienyl-ruthenium and cyclopentadienyl-osmium chemistry. Convenient high-yield synthesis of some cyclopentadienyl ruthenium or osmium tertiary phosphine halide complexes. *Aust J Chem*. 1977;30:1601-1604.
32. Shriver, D. Atkins P. *Inorganic Chemistry*. 4th ed. (Freeman WH, ed.); 2006.
33. Atkins PPJ. *Atkins Physical Chemistry*. 9th ed. (Press OU, ed.); 2010.
34. L.V. Syro, L.D. Ortiz, B.W. Scheithauer, R. Lloyd, Q. Lau, R. Gonzalez, H. Uribe, M. Cusimano, K. Kovacs EH. Treatment of Pituitary Neoplasms With Temozolomide. *Cancer*. 2011;1:454-462.
35. Chuma A et al. The reaction mechanism for the organocatalytic ring-opening polymerization of L-lactide using a guanidine-based catalyst: Hydrogen-bonded or covalently bound? *J Am Chem Soc*. 2008;130:6749-6754.

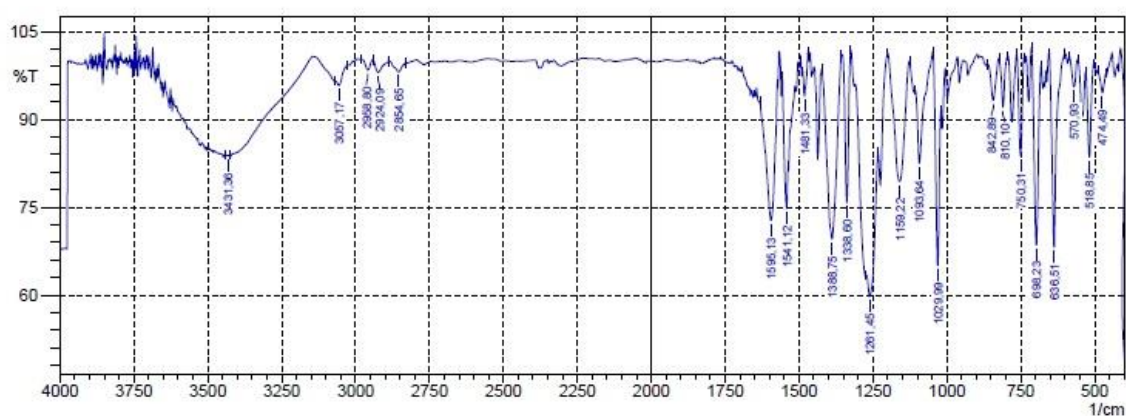
36. Nogueira G. Funcionalization of biocompatible polyesters with substrates of biological interest via organocatalyzed ring-opening polymerization: application in cancer therapy. 2015.
37. Lau JK, Deubel D V. Hydrolysis of the Anticancer Drug Cisplatin : Pitfalls in the Interpretation of Quantum Chemical Calculations. 2006:103-106.
38. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Minor L. Cell Viability Assays.
39. Cell counting WST8.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/96992?lang=pt®ion=PT>. Accessed June 1, 2016.
40. Shriver DF, Drezzdon MA. *The Manipulation of Air Sensitive Compounds*. 2nd Editio.
41. Terapia Fotodinâmica. [http://cepof.ifsc.usp.br/noticias/reportagem da Nat/s](http://cepof.ifsc.usp.br/noticias/reportagem-da-Nat/s). Accessed May 10, 2016.

Anexos



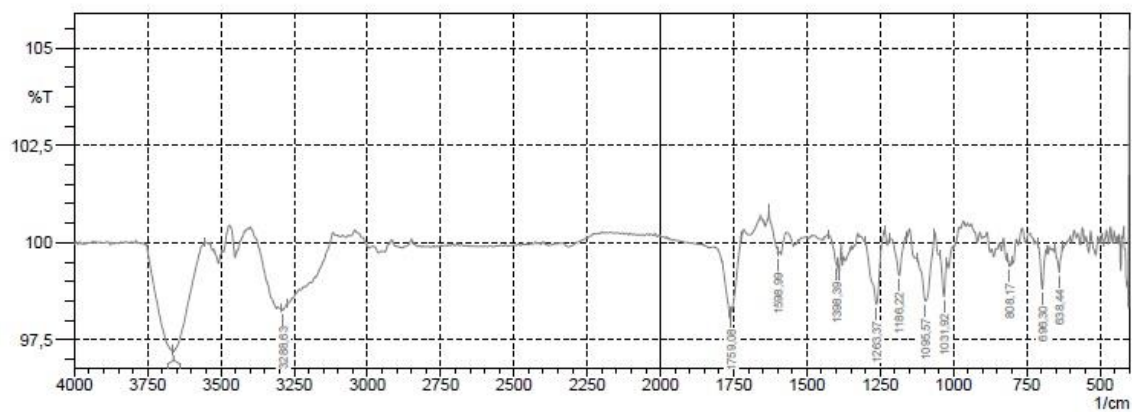
No.	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	516,92	51,376	24,896	534,28	484,13	4,961	2,436
2	696,3	48,453	52,062	723,31	650,01	6,617	6,743
3	835,18	91,041	8,648	844,82	819,75	0,368	0,361
4	1018,41	88,395	7,453	1024,2	1008,77	0,533	0,241
5	1089,78	77,08	18,125	1109,07	1039,63	2,517	1,532
6	1184,29	90,77	9,7	1203,58	1165	0,741	0,82
7	1298,09	68,98	20,084	1311,59	1203,58	7,336	4,233
8	1433,11	67,214	13,014	1450,47	1427,32	1,882	0,338
9	1558,48	88,787	11,607	1570,06	1544,98	0,397	0,437
10	1598,99	78,111	23,323	1612,49	1577,77	1	1,247
11	1691,57	43,031	56,527	1745,58	1614,42	14,551	14,367
12	2667,55	97,013	3,233	2715,77	2621,26	0,547	0,65
13	2974,23	97,179	1,864	2995,45	2919,3	0,41	0,227
14	3053,32	91,742	6,969	3107,32	3024,38	1,523	1,115

Anexo 1.1 – Espectro de IV do complexo (1)



No.	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	474,49	94,809	3,616	487,99	460,99	0,44	0,218
2	518,85	83,553	15,165	530,42	503,42	1,017	0,877
3	570,93	95,519	4,933	586,36	557,43	0,243	0,302
4	636,51	68,171	33,147	653,87	599,86	2,428	2,727
5	698,23	68,549	32,21	713,66	680,87	2,34	2,432
6	750,31	83,723	17,088	763,81	738,74	0,84	0,931
7	810,1	92,043	8,542	823,6	792,74	0,349	0,431
8	842,89	93,193	6,68	862,18	823,6	0,528	0,507
9	1029,99	65,025	30,02	1047,35	1020,34	2,383	1,949
10	1093,64	82,472	14	1107,14	1047,35	1,919	1,456
11	1159,22	79,379	21,114	1199,72	1126,43	3,666	3,844
12	1261,45	59,722	9,655	1273,02	1232,51	7,141	1,636
13	1338,6	75,718	25,788	1355,96	1325,1	1,33	1,524
14	1388,75	69,578	30,293	1423,47	1355,96	5,38	5,329
15	1481,33	93,903	5,36	1487,12	1469,76	0,262	0,249
16	1541,12	74,764	10,273	1556,55	1537,27	1,645	0,695

Anexo 1.2 – Espectro de IV do complexo (2)

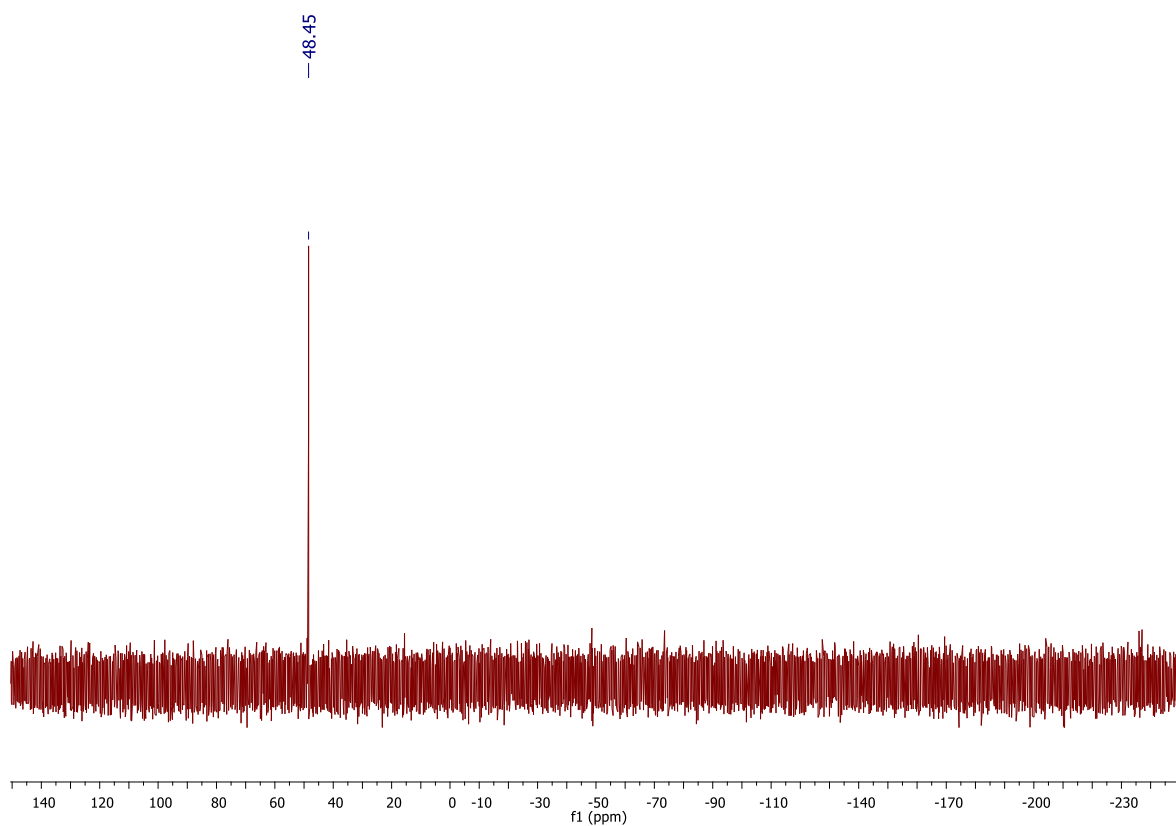


No.	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	638.44	99,232	0,675	653,87	628,79	0,047	0,036
2	696,3	98,805	1,092	713,66	682,8	0,07	0,058
3	808,17	99,386	0,19	815,89	800,46	0,035	0,007
4	1031,92	98,612	0,968	1047,35	1022,27	0,091	0,047
5	1095,57	98,495	1,432	1124,5	1064,71	0,215	0,199
6	1186,22	99,156	0,98	1217,08	1163,08	0,059	0,09
7	1263,37	98,414	1,797	1301,95	1234,44	0,195	0,251
8	1398,39	99,417	0,145	1427,32	1394,53	0,022	-0,001
9	1598,99	99,658	0,175	1629,85	1597,06	-0,027	0,017
10	1759,08	98,208	0,239	1762,94	1726,29	0,172	0,043
11	3288,63	98,262	0,099	3296,35	3273,2	0,169	0,005
12	3660,89	97,189	0,106	3662,82	3554,81	0,666	0,05
13	3660,89	97,189	0,106	3662,82	3554,81	0,678	0,027

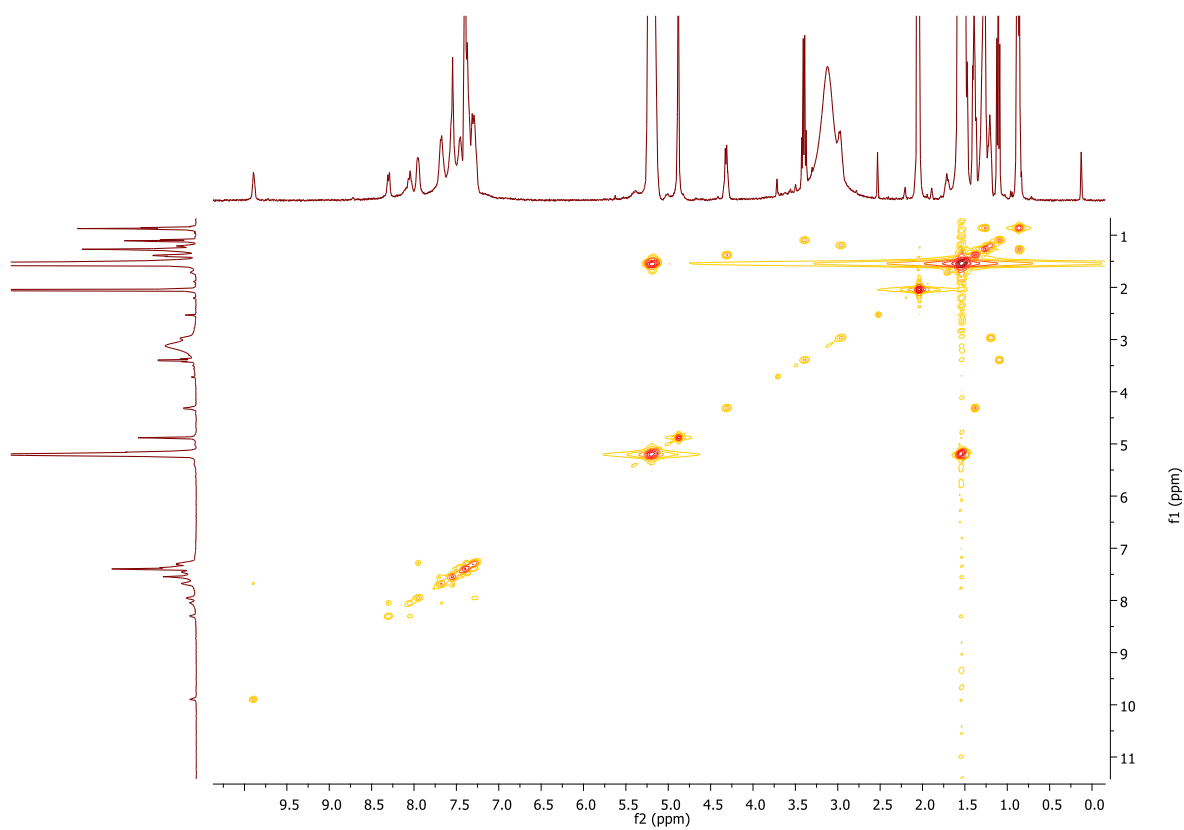
Anexo 1.2 – Espectro de IV do complexo (3)

IC ₅₀ (μM)	MMQ	GH3
TM90	0.0097	0.0013

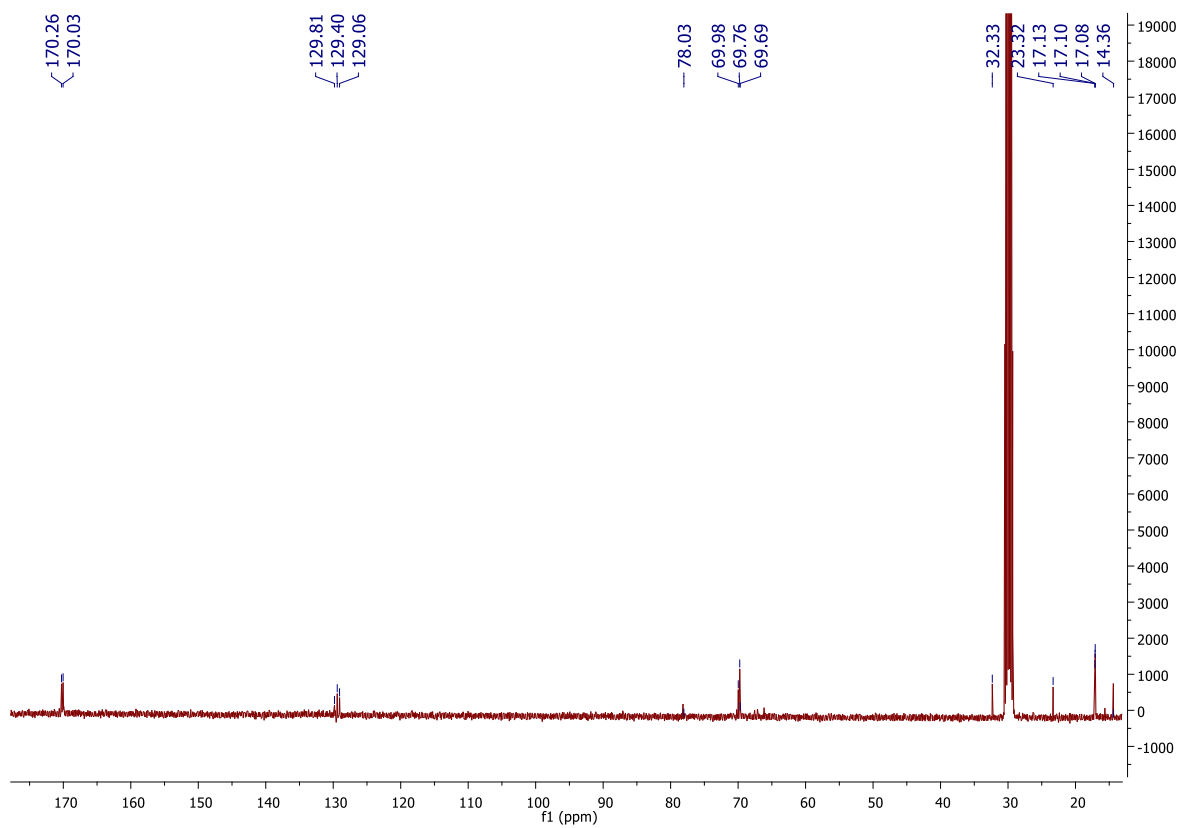
Anexo 2.1 – Valores de IC₅₀ para o composto TM90 nas linhas celulares MMQ e GH3 após 48 horas de exposição



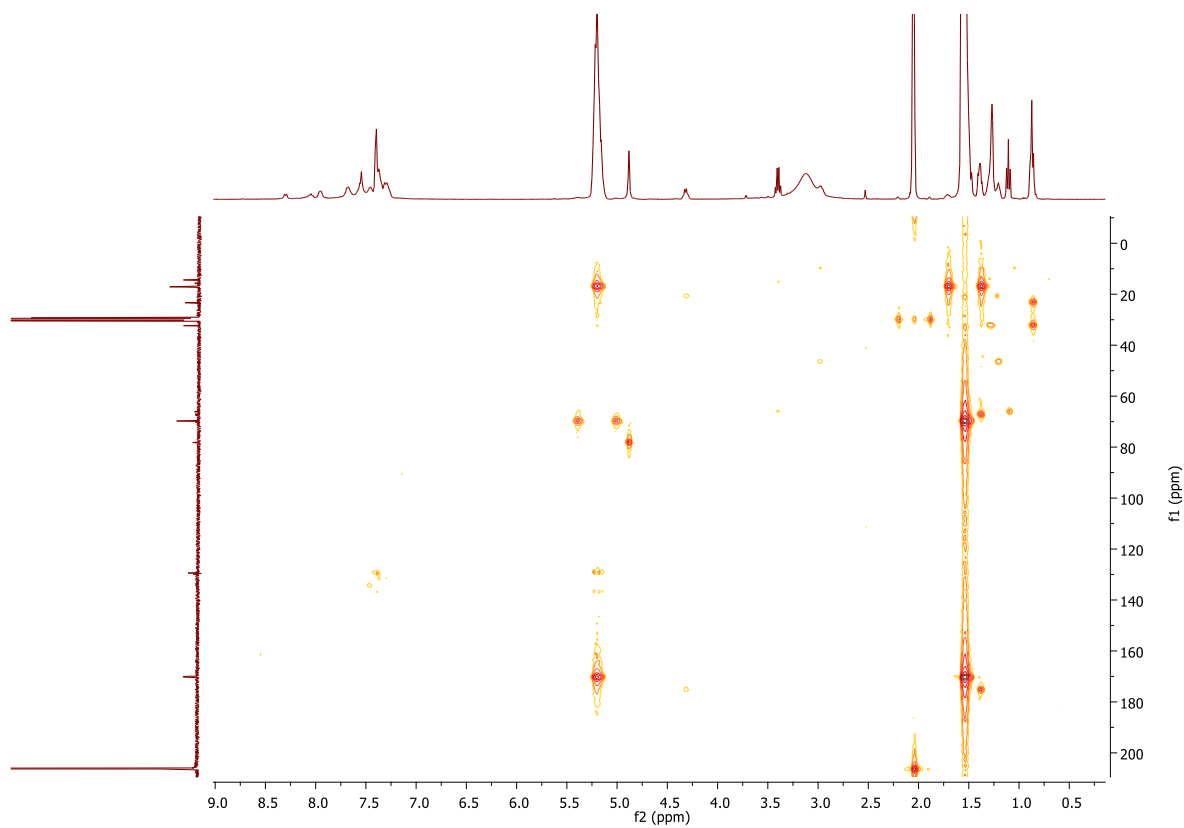
Anexo 3.1 – Espectro de RMN ^{31}P relativo ao complexo (3)



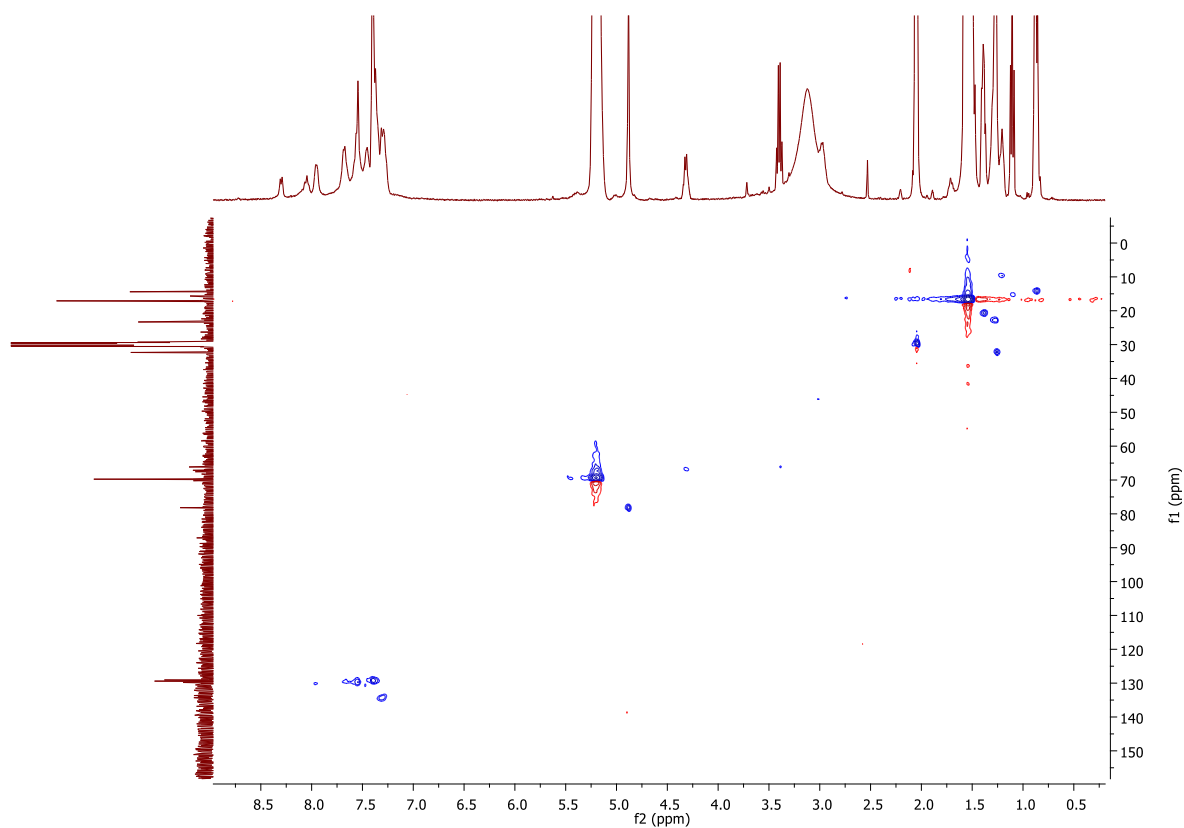
Anexo 3.2 – Espectro de RMN bidimensional COSY em acetona- d_6 do complexo (3)



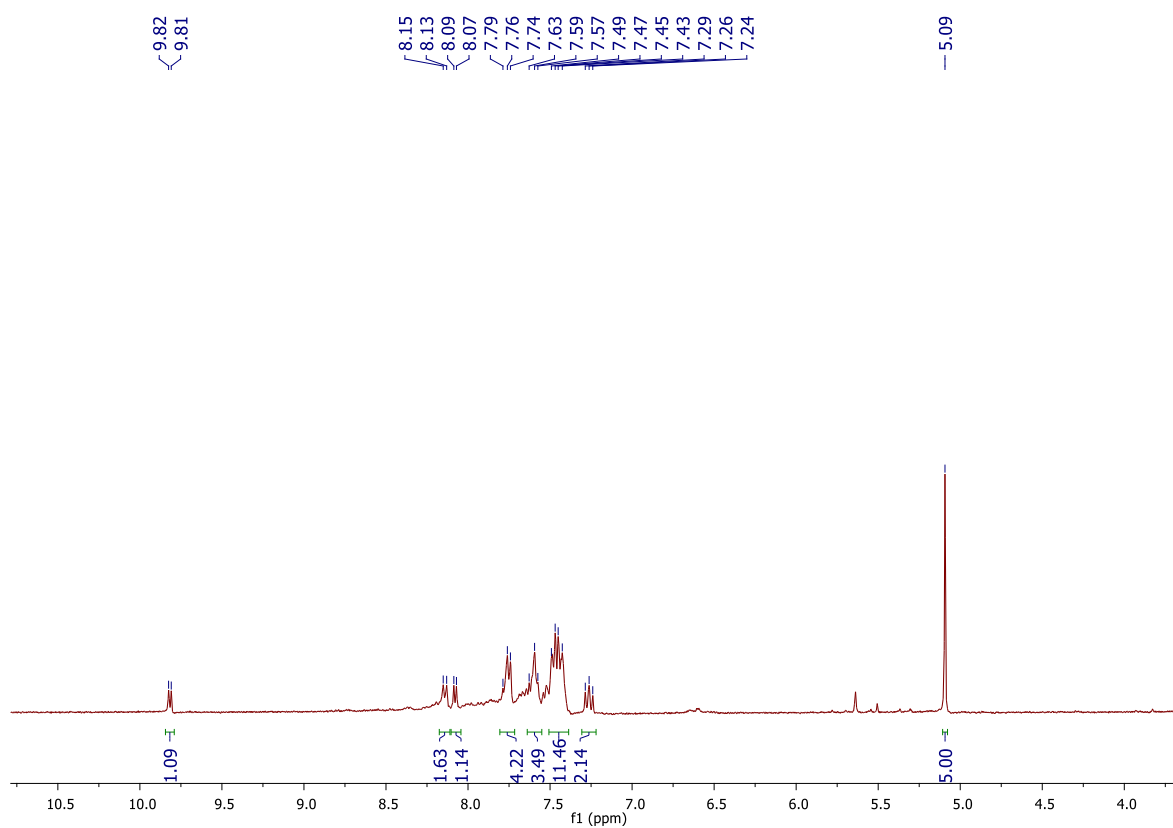
Anexo 3.3 – Espetro de RMN ^{13}C em acetona- d_6 do complexo (3)



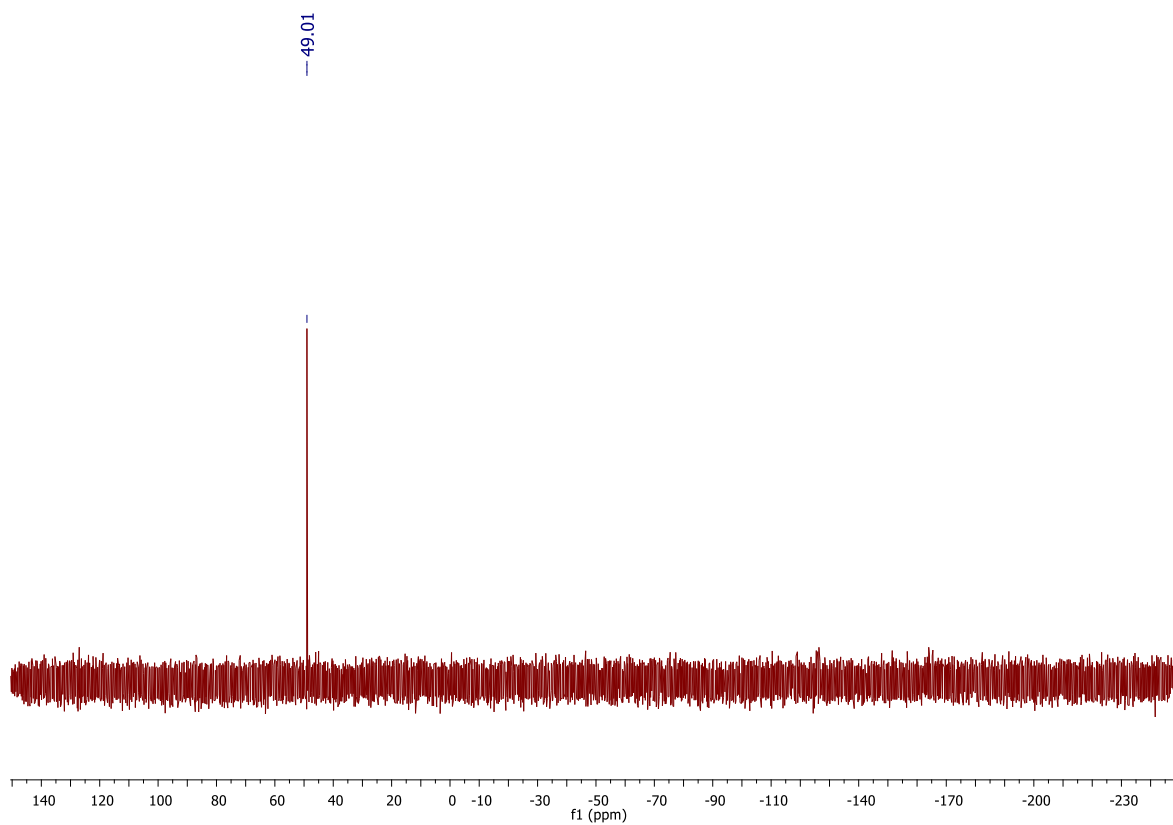
Anexo 3.4– Espetro de RMN bidimensional HMBC em acetona- d_6 do complexo (3)



Anexo 3.5– Espetro de RMN bidimensional HMQC em acetona-d6 relativo ao complexo **(3)**



Anexo 4.1 – Espetro de RMN ^1H em acetona-d6 relativo ao complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_6)_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}))_2(\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{NO})][\text{CF}_3\text{SO}_3]$



Anexo 4.2 – Espetro de RMN ^{31}P em acetona- d_6 relativo ao complexo $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_6)_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}))_2(\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{NO})][\text{CF}_3\text{SO}_3]$